FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

FUNCIONES DE p21 EN LA REGULACIÓN GÉNICA Y EN LA APOPTOSIS POR INHIBIDORES DE TIROSINA-QUINASA. ESTUDIO EN MODELOS DE CÁNCER COLORECTAL Y LEUCEMIA MIELOIDE.

Tesis Doctoral presentada por
Nuria Ferrándiz Díaz para optar
al Grado de Doctora por la Universidad de Cantabria
Julio 2007

Mª Dolores Delgado Villar, Profesora Titular de Bioquímica y Biología Molecular, y **Javier Léon Serrano,** Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular.

CERTIFICAN: que la Lda Nuria Férrandiz Díaz ha realizado bajo su dirección el presente trabajo titulado "Funciónes de p21 en regulación génica y en la apoptosis mediada por inhibidores de tirosina-quinasa. Estudio en modelos de cáncer colorectal y leucemia mieloide" en el Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria.

Consideramos que este trabajo reúne los requisitos de originalidad y calidad científica necesarios para su presentación como Memoria de Doctorado por la interesada, al objeto de poder optar al grado de Doctora por la Universidad de Cantabria.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmamos el presente certificado.

Santander, a 20 de Julio de 2007

Mª Dolores Delgado Villar Javier León Serrano

Esta Tesis ha sido realizada en el Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria. La financiación necesaria para la realización de esta Tesis doctoral ha sido aportada por el Ministerio de Educación y Ciencia (SAF02-4193 y SAF05-00461) y un proyecto de la Fundación Marqués de Valdecilla (API05-17). La autora de este trabajo ha disfrutado de una beca predoctoral de Formación de Profesorado Universitario (FPU) (2003-2007), concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia y un contrato de las Redes Temáticas de Investigación Cooperativa (ISCIII-RETIC RD06/0020).

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, tengo que agradecer a las dos personas que han sido mis directores de tesis , Dolores Delgado y Javier León, por el gran apoyo recibido durante estos años, por haberme dado la oportunidad de realizar la tesis en su laboratorio y por haber sido más que “mis maestros”. A Javier le agradezco el haberme guiado, enseñado (no siempre fue fácil…) y sobre todo por haberme contagiado con el duende de este trabajo. A Dolores por su optimismo, por ver siempre la otra parte de las cosas y por estar siempre cerca.

También quiero agradecer a José Carlos Rodríguez, por relajar siempre el ambiente del laboratorio.

A Marta Albajar, porque sin duda, sin tu ayuda este camino habría sido más difícil. Muchas gracias por todo Marta.

A Alberto Gandarillas, por cuidarnos tan bien y sobre todo por el granito de arena que has aportado a esta Tesis.

Ahora tengo que agradecer a muchas personas que han compartido conmigo esta aventura. He tenido la inmensa suerte de vivir dos tiempos, y los dos igual de especiales.

A los que ya estaban cuando llegue y a los que llegaron conmigo: Eva, Nuria Ajenjo, Estela, Vicky, Imanol, David, Miriam, Titus, Vero, Jovanna, Lorena, Esther, María, Berta, Vero, Emma, Carmen, Pepa, Chepe, Rafa, Pilar, Sandra, Mónica, Iñigo y no me puedo olvidar de la gente de genética (Mapi, Blanca, Raúl, María, Carolina, Leti…). A cada uno de vosotros gracias por estos años, por haber tenido siempre un momento.

A los que ha llegado más recientemente; sobre todo a los mosqueteros que han traído verdadera “tetosterona” al laboratorio; Gaby (por tu perserverancia y por los ritmos musicales!!!), Pablo (por ser tán cortés y siempre tener un “si” para todo), Juan (el último fichaje) y Manuel (sin duda por nuestra complicidad, porqué has acabado conociéndome muy bien y como no, siempre fuiste mi favorito), a Silvia, ha sido todo un placer estos últimos meses contigo. Y a los chicos del sótano: Magui (nunca pierdas a esa niña que llevas dentro!!!!), Marcos (por nuestras largísimas conversaciones, fuesen donde fuesen, gracias Marcos lo has hecho todo más fácil), Jorge (por tú simpatía), Adán, Paula, Ana (la más “chunga” de los pieros, pero eres un encanto) y Javi (nunca olvidaré la tarde de los contenedores). Mucha suerte a todos.

Con muchos de vosotros he compartido algo más que horas de “poyata”.

Gracias Miriam, por el calor con que me acogiste.

A Jovanna, Berta, Vicky y Mónica, mis incansables trotadoras, gracias por todos esos cafés, vinos, “Noches de Chicas”, por vuestros buenos consejos, en definitiva por estar siempre, siempre que os necesité, que han sido más momentos de los que me hubiera gustado.

Gracias, Estela, por tu continúa hospitalidad y por aquella tarde de hace algo más de 4 años, que razón tenías!!!!!

Que puedo decir de los “chicos”: Nunca olvidaré esas comidas y cenas en mi casa, los días de “pinzicas” y por haberme cuidado tan bien. Gracias Manolin, por saber siempre como hacerme sonreír, decías que en una de estas perdería los dientes, y que razón tenías!!!. A Titus, que te voy a decir, gracias por todos esos cafés, por todo lo que hemos compartido, que ha sido mucho y por haberme permitido ser tú “superflua”. A David, tendría muchas cosas que escribir, gracias por aquel verano, por conocerme tan bien, por hacer que todo fuese fácil….ni te imaginas lo que te he echado de menos.

A Emma porque han sido muchos los momentos que hemos vivido juntas y sobre todo, porque no sé lo que habría hecho sin ti estos últimos meses y sin nuestros “Journals”. A Iñigo por ser tan especial, por tener siempre unas palabras de ánimo y por cuidar del Mori tan bien.

Gracias Rosa, porque siempre has sabido como estaba sin necesidad de decir nada. Por hacer que todo parezca fácil a tu lado, y como no por aquellos macarrones que me supieron a gloria.

Gracias Vero, yo si que no sé lo que habría sido todos estos años sin ti. Gracias por tus abrazos, tus llamadas, tu atención, y como no por esas maravillosas croquetas. Son muchas más cosas….pero la más importante ya te la escribí un día. Vero, vamos a por la próxima!!!!

A Celsi (“Mi Canaria”) porque aunque fue muy corto tiempo el que estuvimos juntas, han sido muchos los momentos que hemos seguido compartiendo. Mucha Suerte !!!!.

Lorena, sin duda has sido una pieza fundamental en todo esto, gracias estar siempre ahí, por compartir conmigo la otra parte de las cosas, porqué he ganado una amiga y una confidente. Siempre te llevaré en mi corazón. Ánimo, siempre podemos rellenar los papeles si nos va mal.

Muchas gracias a mis amigas de siempre, por estar siempre, a pesar de tantas idas y venidas.

A mi “mas mejor amiga”, Manoli, porque juntas hemos dado cada uno de los pasos de nuestra vida y son muchas las veces que te echo de menos.

Gracias a toda mi familia, por hacer un esfuerzo por entender todo esto.

A mi hermano, que te voy a decir, has sido más que un hermano y lo sabes, a ti no te he podido nunca ocultar nada. Gracias por permitirme hacer esto, por demostrarme que era posible.

A Fuensanta, por hacer el esfuerzo de leerte esta Tesis, hay que tener valor!!!. Gracias por mantener la armonía, sé que no ha sido fácil.

A Ismael, eres el capitán del barco. Gracias por no permitir que se apagase la luz, por hacer de mi ilusión la tuya. Por entender cada uno de los “No puedo”, tengo que ir al labo. Por no permitirme naufragar y hacerme creer que de verdad podía. Gracias por cuidar siempre de mi.

Y finalmente, lo más importante, gracias a mis padres, sin vosotros nada hubiera sido posible. Gracias por vuestro apoyo incondicional, por dármelo todo, por haberme enseñado el valor de las cosas. Pero sobre todo, por entender que quisiese seguir mis sueños, nunca fue fácil lo sé, pero aquí estamos y eso es lo que importa.

AGRADECIMIENTOS A COLABORADORES

Me gustaría agradecer a todos aquellos investigadores e instituciones que han proporcionado materiales, técnicas y financiación, sin las cuales no habría sido posible el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar agradezco al Dr. Jorge Martín-Pérez (Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols") por haberme acogido en su laboratorio y haber puesto a mi disposición todo el material y los conocimientos sobre el mundo de las quinasas.

También agradezco al Dr. Paolo Dotto por haberme dado la oportunidad de realizar una estancia en el "Massachusetts General Hospital", en Boston y por su gran hospitalidad. A la Dra. Cuc Nguyen del laboratorio de P. Dotto por su ayuda durante los meses que pase en este laboratorio.

También mi agradecimiento al Doctor Bert Volgestein (The Johns Hopkins Oncology Center Baltimore, Maryland, USA) por la cesión de las células HCT116.

A los Drs. Carmen González Vela y Jorge Cuevas del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Marqués de Valdecilla, por las muestras de cáncer colorectal.

A los Drs. Almudena Castaño y Fernando Ribera del servicio de oncología del Hospital Marqués de Valdecilla, por su ayuda en el estudio del cáncer colorectal.

A la Dra. Mª José Muñoz por la generación de la línea celular Kp21 y por las hibridaciones de Cdc25 A/ B de la figura 4.45.

A la Dra. Verónica Torrano por su ayuda con el programa informático "Ingenuity System".

A Dª Rosa Blanco por su ayuda en numerosas técnicas, sobre todo en los estudios de cáncer colorectal.

A Dª María Aramburu por su valiosa ayuda en las técnicas de citometría de flujo.

A todos aquellos que han suministrado plásmidos y anticuerpos como:

-Dra. Carmen Marín (Universidad de León)

-Dr. Axel Weber del laboratorio del Dr. Martín Eilers (Universidad de Marburg, Alemania)

-Dr. Amancio Carnero (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas,CNIO)

-Dra. Neus Agell (Universidad de Barcelona)

-Novartis por Imatinib y AstraZeneca por Gefitinib

Para mi madre

“El que busca la verdad
corre el riesgo de encontrarla”
Isabel Allende

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ADR	Adriamicina
AraC	1-b-D-arabinofuranosilcitosina
ATCC	Amirican Type Culture Collection
AURKA	Aurora quinasa A
AURKB	Aurora quinasa B
BIRC-5	Survivina
BrdU	Bromodeoxiuridina
BSA	Albúmina de suero bovino
BUB	"budding uninhibited by benzimidazoles"
CCR	Carcinoma colorectal
CCNA	Ciclina A
CCNB	Ciclina B
CCNE	Ciclina E
CDI	Dominio de inhibición de complejos ciclina -Cdk
Cdc25	"cell division cycle 25 homolog "
Cdk	Quinasa dependiente de ciclina
CDKN1A	Cyclin-Dependient Kinase inhibitor 1 B
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CENPF	Proteína F de unión a centrómero
Chx	Cicloheximida
CKIs	Proteínas inhibidoras de Cdks
CTD	Región básica
DAPI	4´,6- diamino-2-fenilindol
DBD	Dominio de unión a DNA
DD	Dominate negativo
DHFR	Dihidrogenofosfato reductasa
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecos (Dulbecco´s modified Eagle´s medium)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótido trifosfato
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetracético
EGF	Factor de crecimiento epidermico
FCS	Suero de ternera fetal
fig	Figura
5´-FU	5´-fluoracilo
G418	Geneticina
GFP	Proteína de fusión verde
H4	Histona 4
INK	Inhibidor de Cdks
INF-γ	Interferon γ
kb	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
KIF	"Chromokinesin"
LMC	Leucemia mieloide crónica
MAD2L1	"MAD2 mitotic arrest deficient-like 1"

MCM	Genes de mantenimiento de los minicromosomas
min	Minutos
MLLT11	"myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia "
MMR	"Mistmach repair"
MOPS	Ácido morfolinopropano sulfónico
MPF	Factor promotor de la mitosis
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MTS1	Multiple tumor supressor 1
NIMA	"Never in mitosis " gen
NLS	Señal de localización nuclear
4-OHT	4-hidroxi-tamoxifeno
ORC	Complejo de unión al origen de replicación
PARP	Poly-(ADP-ribosa) polimerasa
pb	Par de bases
PBS	Tampón de fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento asociado a plaquetas
PM-MM	Perfect Match-Mismatch
PLK1	"Polo like " Kinase
pRS	pRetroSuper
pSR	pSuperRetro
Pro-Rich	Región rica en prolinas
R	Punto de restricción
Rb	Retinoblastoma
RFC	Factor de replicación
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio de cultivo (Roswell Park Memorial Institue)
RPS14	Proteina Ribosomal pequeña S14
RT	Transcripción inversa
SCF	"Stem Cell " Factor
SDS	Sulfato de dodecilo sódico
Ser	Serina
SMC	"Structural maintenance of chromosome"
STA	Estaurosporina
TA	Dominio de transactivación
TAE	Tampón Tris-acetato EDTA
TBE	Tampón Tris-borato EDTA
TNF	Factor de necrosis tumoral
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
u.a	Unidades arbitrarias
WT	“Wild Type”, silvestre
Zip	cremallera de leucinas

ÍNDICE

ÍNDICE

	Página
1-Introducción	**3**
1.1 Control molecular del ciclo celular.	**3**
1.1.1 Aspectos generales.	3
1.1.2 CDKs y ciclinas.	4
1.1.3 Progresión del ciclo celular.	7
1.1.4 Inhibidores del ciclo celular CKI: familias INK y Cip.	12
1.2 La proteína inhibidora de quinasa dependiente de ciclinas p21^{Cip1}.	14
1.2.1 Estructura de p21.	15
1.2.2 Funciones de p21.	17
1.2.2.1 p21 y control del ciclo celular.	17
1.2.2.2 p21 y apoptosis.	19
1.2.3 Regulación de p21.	21
1.2.4.Degradación de la proteína p21.	22
1.2.5 p21 y cáncer.	23
1.3 p53.	**24**
1.3.1 Estructura de p53.	25
1.3.2 Modificaciones post-traduccionales de p53.	27
1.3.3 Funciones de p53.	29
1.3.3.1 p53 y el ciclo celular.	30
1.3.3.2 p53 y apoptosis.	31
1.3.4 p53 y carcinogénesis.	33
1.4. Modelos celulares utilizados en esta Tesis.	**34**
1.4.1 Modelo celular HCT116	34
1.4.2 Modelo celular K562.	35
1.5 Cáncer colorectal.	**36**
1.6 Fármacos utilizados en esta Tesis.	**38**
1.6.1 Imatinib	38
1.6.2 Adriamicina	40
2.-Objetivos	**45**
3-Materiales y Métodos	**49**
3.1 Análisis del DNA y RNA.	**49**
3.1.1 Obtención del DNA plásmidico, digestión con endonucleasa de restricción y electroforesis en geles de agarosa.	49
3.1.2 Marcaje radiactivo de sondas.	49
3.1.3 Plásmidos utilizados.	50
3.1.4 Preparación del DNA genómico e hibridación de Southern blot.	52
3.1.5 Preparación del RNA total e hibridación por Northern blot.	53
3.1.6 Análisis de la expresión génica por Macroarray.	54
3.1.7 Secuenciación de DNA mediante la transcripción inversa (RT) y PCR.	55
3.1.8 Análisis de la expresión del Microarray.	56
3.1.9 Transcripción inversa (RT) y PCR cuantitativa.	57
3.2 Análisis de proteínas.	**59**
3.2.1 Análisis por Western blot.	59
3.2.2 Inmunoprecipitación.	63

Página

3.2.3 Inmunofluorescencia. 63

3.3 Cultivos Celulares. 64
3.3.1 Obtención de sublíneas transfectantes estables. 65
3.3.2 Transfecciones transitorias. 66
3.3.3 Ensayo luciferasa. 67
3.3.4 Experimentos de proliferación y viabilidad celular. 68
3.3.4.2 Viabilidad celular por azul tripano. 68
3.3.4.2 Viabilidad celular por ensayos de WST-1. 68
3.3.4.3 Ensayos de formación de colonias. 68
3.3.5 Determinación de la apoptosis. 69
3.3.5.1 Análisis de la fase sub Go-G1 del ciclo celular. 69
3.3.5.2 Análisis de apoptosis por unión de Anexina-V. 69
3.3.5.3 Proteolísis de la proteína PARP. 70

3.4 Tratamientos con fármacos. **70**
3.4.1 Tratamiento con imatinib. 70
3.4.2 Tratamiento con gefitinib. 70
3.4.3 Tratamiento con adriamicina (doxorubucina). 71
3.4.4 Tratamiento con 5-fluoracilo. 71

3.5 Análisis de muestras clínicas de cáncer colorectal. **71**

4-Resultados **75**

4.1 Papel de p21 en la respuesta a fármacos inhibidores de tirosina-quinasa. **75**

4.1.1. Efectos de imatinib en proliferación y apoptosis de cáncer colorectal. 75
4.1.1.1 Efecto de imatinib en proliferación celular. 75
4.1.1.2 Estudio de la apoptosis inducida por imatinib. 77
4.1.1.3 Análisis de dianas celulares de imatinib. 80

4.1.2 Modulación de p21 y su efecto sobre la apoptosis mediada por imatinib. 81
4.1.2.1 Represión de p21 inducida por la sobre-expresión de Myc en HCT116. 82
4.1.2.1.1 Obtención de transfectantes estables con expresión condicional de Myc. 83
4.1.2.1.2 Efecto de la expresión ectópica de Myc sobre la apoptosis inducida por imatinib. 84
4.1.2.2 Expresión ectópica de p21. 86
4.1.2.2.1 Obtención de transfectantes estables con expresión condicional de p21en HCT116p21$^{-/-}$. 86
4.1.2.2.2 Efecto de la expresión ectópica de p21 sobre la apoptosis inducida por imatinib. 88
4.1.2.3 Silenciamiento de la expresión de p21. 90
4.1.2.3.1 Obtención de transfectantes estables con shp21 en la línea celular HCT116. 90
4.1.2.3.2 Efecto de la supresión de p21 sobre la apoptosis inducida por imatinib. 91

4.1.3 Expresión diferencial de genes entre HCT116 y HCT116p21$^{-/-}$ en presencia y ausencia de imatinib. 93

4.1.4 Expresión, actividad y modificaciones postraduccionales del factor de transcripción p53 en el modelo celular HCT116p21$^{-/-}$. 96
4.1.4.1 Expresión y actividad de p53 en HCT116p21$^{-/-}$ 96
4.1.4.2. Estabilidad y modificaciones postraduccionales de p53 97
4.1.4.3. Efecto de la modulación de p21 sobre la expresión de p53. 100

Página

4.1.5 Silenciamiento de la expresión de p53 en HCT116p21$^{-/-}$ y resistencia a fármacos. 102
4.1.5.1 Obtención de sublíneas con silenciamiento de p53. 102
4.1.5.2 Efecto de la supresión de p53 en HCT116p21$^{-/-}$ y resistencia a fármacos. 104

4.1.6 Papel de p21 en la respuesta a imatinib en leucemia mieloide crónica. 108

4.2 Estudio de los perfiles de expresión génica asociados a la inducción de p21. 110

4.2.1 Agrupamiento jerárquico de genes expresados diferencialmente en respuesta a la inducción de p21. 111

4.2.2 Perfiles de expresión asociados a la inducción de p21 durante 12 h. 112

4.2.3 Genes implicados en la progresión del ciclo celular, mitosis y replicación del DNA. 124
4.2.3.1 Perfil de la expresión génica. 124
4.2.3.2 Validaciones de la expresión génica. 127
4.2.3.3 Comparación de la expresión génica regulada por p21 y por p27. 130

4.2.4 Estudio de los dominios de p21 sobre sus efectos en represión génica. 132

4.3 Estudio de la expresión de p21, p27, p57 y c-Myc en muestras de cáncer colorectal. 134

5- Discusión 139

5.1 Papel dual de p21 en apoptosis. 139

5.2 ¿Tiene p21 un papel protector de la apoptosis en células de cáncer colorectal?. 141

5.3¿A que se debe la hipersensibilidad a la apoptosis de las células HCT116p21$^{-/-}$?. 142

5.4 p21 protege a las células K562 de la apoptosis por imatinib. 145

5.5 Comparación de la regulación génica inducida por p21 y p27. 146

5.6 p21 no es un marcador de pronostico en cáncer colorectal. 150

6-Conclusiones 153

7-Referencias 159

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Introducción

Figura 1.1 Fases del ciclo celular en mamíferos
Figura 1.2 Familias de Cdks y ciclinas
Figura 1.3 Activación secuencial de los complejos ciclina-Cdks durante las fases del ciclo celular en mamíferos
Figura 1.4 Identificación de las ciclinas como proteínas que se acumulan y se degradan rápidamente en distintas fases del ciclo celular
Figura 1.5 Control del punto de restricción R
Figura 1.6 Activación de las CKIs
Figura 1.7 Dominios estructurales de los inhibidores de la familia Cip/Kip
Figura 1.8 Estructura del gen humano CDKN1A
Figura 1.9 Diagrama de lazos del monómero PCNA unido al péptido p21Cip1
Figura 1.10 Papel de p21 en el destino final en respuesta a daño al DNA
Figura 1.11 Múltiples factores participan en la inhibición del promotor de p21
Figura 1.12 Esquema del gen humano p53 y de las isoformas de la proteína
Figura 1.13 Mutaciones en la proteína p53
Figura 1.14 Fosforilación de la proteína humana p53 en condiciones de estrés genotóxico o durante la proliferación Celular y la senescencia
Figura 1.15 Interacción funcional entre fosforilación, acetilación y ubiquitilación de p53
Figura 1.16 Vías dependientes de p53 que median la parada del ciclo celular y la apoptosis
Figura 1.17 Actividades proapoptóticas mitocondriales y citosólicas independientes de la transcripción de p53
Figura 1.18 Mecanismo de acción de imatnib
Figura 1.19 Interacción de ADR con el DNA

Materiales y métodos

Figura 3.1 Mutación del gen p21 por recombinación homologa en la línea celular HCT116p21$^{-/-}$
Figura 3.2 Ejemplo de una imagen HS-002
Figura 3.3 Ejemplo de archivo imagen “ CEL”

Resultados

Figura 4.1 Confirmación de las delecciones de p21 y p53 en sublíneas HCT116
Figura 4.2 Ensayos dosis-respuesta de las líneas HCT116 con fármacos genotóxicos e inhibidores tirosina-quinasa
Figura 4.3 5 Ensayos de citotoxicidad en las líneas celulares HCT116WT y HCT116p21$^{-/-}$
Figura 4.4 La línea HCT116p21$^{-/-}$ presenta una mayor población de células en la fase Sub-Go
Figura 4.5 Análisis de la apoptosis mediada por la rotura de la proteína PARP

Figura 4.6 La línea celular HCT116p21$^{-/-}$ presenta mayor unión a anexina V
Figura 4.7 Las células tratadas con imatinib no presentan fosforilación de la histona H2AX
Figura 4.8 Estudio de las dianas terapéuticas de imatinib
Figura 4.9 HCT116p21$^{-/-}$ presenta una elevada actividad quinasa respecto HCT116WT
Figura 4.10 Imatinib no induce cambios en la expresión de c-Myc
Figura 4.11 Análisis de las sublíneas HCT116Myc-ER
Figura 4.12 Myc induce una disminución de la expresión de la proteína p21
Figura 4.13 Imatinib no induce cambios de expresión de Myc
Figura 4.14 La expresión ectópica de Myc no modifica la apoptosis por imatinib en HCT116
Figura 4.15 Análisis de los clones con p21 inducible
Figura 4.16 Cinética de inducción de p21 en HKO-MTp21
Figura 4.17 Localización celular de p21 en la línea celular HKO-MTp21
Figura 4.18 La expresión ectópica de p21 no modifica la sensibilidad de la línea celular HKO-MTp21 a imatinib
Figura 4.19 Análisis de la sublíneas HCT-shp21
Figura 4.20 La supresión de p21 no afecta a la apoptosis inducida por imatinib
Figura 4.21 La expresión ectópica de p21 (HKO-MTp21) o el silenciamiento de p21 (HCT-shp21), no modifican la sensibilidad a fármacos genotóxicos (ADR y 5FU), ni a inhibidores tirosina-quinasa (imatinib y gefitinib)
Figura 4.22 Imatinib no induce cambios de expresión de Bax y Bcl-2
Figura 4.23 Análisis por macroarray de genes de apoptosis
Figura 4.24 La línea deleccionadas en p21 presenta mayores niveles de expresión de p53
Figura 4.25 Imatinib no induce cambios de expresión de p21, p27 y p57
Figura 4.26 La línea HCT116p21$^{-/-}$ tiene mayor actividad transactivadora de p53 que la línea celular HCT116WT
Figura 4.27 La proteína p53 tiene mayor estabilidad en la línea celular HCT116p21$^{-/-}$ respecto a la línea HCT116WT
Figura 4.28 La línea mutada en p21 presenta modificaciones postraduccionales en p53 que le permiten aumentar su estabilidad
Figura 4.29 La línea celular HCT116p21$^{-/-}$ presenta altos niveles de expresión de p53
Figura 4.30 Los cambios de expresión de p21 no son responsables del aumento de expresión y de fosforilación de p53 en la línea celular HCT116p21-/-
Figura 4.31 Análisis de sublíneas con silenciamiento en la expresión de p53
Figura 4.32 La supresión de p53 en HCT116p21$^{-/-}$ disminuye la sensibilidad a inhibidores tirosina-quinasa
Figura 4.33 La supresión de p53 confiere resistencia a fármacos
Figura 4.34 Imatinib actúa por un mecanismo dependiente de p53
Figura 4.35 Esquema resumen del papel de p21 en respuesta a inhibidores tirosina-quinasa
Figura 4.36 Cinética de inducción de p21 en la línea celular Kp21
Figura 4.37 p21 protege de apoptosis inducida por imatinib en el modelo celular K562
Figura 4.38 Esquema del experimento para el análisis del transcriptoma de las células con expresión condicional de p21

Figura 4.39 Agrupación jerarquica de genes agrupados por diferencia de expresión génica en respuesta a p21 tras 12 h y 72 h
Figura 4.40 Agrupación jerarquica de genes agrupados por diferencia de expresión génica en respuesta a 12 h de inducción de p21
Figura 4.41 Agrupamiento funcional de los genes con expresión diferencial a 12 h de inducción de p21
Figura 4.42 Principales redes de conexión para los genes regulados por la expresión ectópica de p21 durante 12 h
Figura 4.43 Agrupación de genes por diferencia de expresión génica en respuesta a 12 h de inducción de p21
Figura 4.44 Agrupamiento funcional de los 65 genes cuya expresión estaba modificada por la expresión de p21
Figura 4.45 p21 regula la expresión de las fosfatasas Cdc25
Figura 4.46 Validación de los genes regulados por p21
Figura 4.47 Comparación de la expresión génica regulada por p21 y p27
Figura 4.48 p21 reprime más severamente genes de ciclo celular y mitosis
Figura 4.49 Esquema de la proteían p21WT y de sus mutantes
Figura 4.50 Estudio de la represión génica por p21WT y los mutantes
Figura 4.51 Expresión de p21, p27, p57 y c-Myc en pacientes de CCR

Discusión

Figura 5.1 Esquema de diferentes respuestas de las células HCT116 a quimioterápicos y agentes naturales quimiopreventivos

1.~ INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Control molecular del ciclo celular

1.1.1 Aspectos generales.

El ciclo celular es el proceso que permite a una célula eucariota duplicar su contenido genético y posteriormente dividirse en dos células genéticamente idénticas. Para ello, el DNA se ha de replicar exactamente y los cromosomas segregarse a las dos células hijas. Además la célula ha de doblar la masa y duplicar todos los orgánulos. El ciclo celular es, por tanto un conjunto complejo de procesos citoplasmáticos y nucleares que han de estar coordinados. Durante la progresión del ciclo de división de una célula, se han identificado 4 fases (fig 1.1) y en su conjunto el proceso (aunque con variaciones) dura unas 24 h: a) Fase S o de síntesis de DNA cuando los cromosomas han sido replicados, b) Fase G2 donde la célula comprueba que la duplicación de su contenido en DNA ha sido correcta, c) Fase M que comprende la división nuclear (mitosis) y citoplasmática (citoquinesis). A partir de este punto las células hijas entran en la interfase de un nuevo ciclo, d) La interfase comienza con la fase G1. Las fases G1 y G2 ("Gap phase") son dos fases de comunicación entre la síntesis de DNA y la mitosis (Cooper and Hausman, 2004). La interfase está compuesta por sucesivas fases G1, S y G2 y normalmente ello supone el 90 % del tiempo total del ciclo celular.

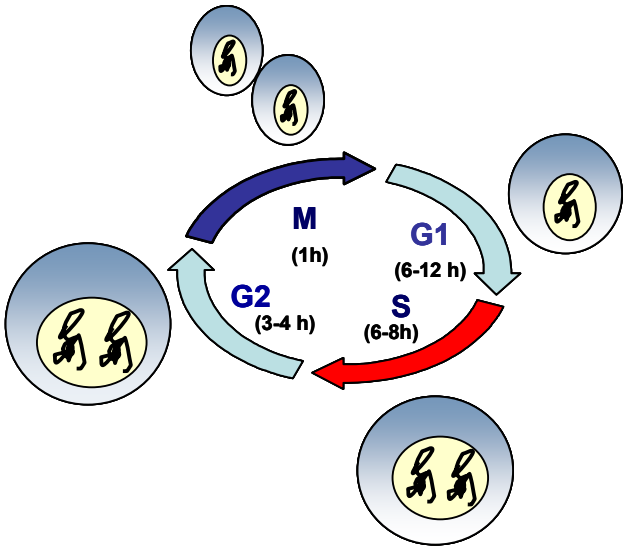


Fig 1.1 Fases del ciclo celular en mamíferos. Se observan las distintas fases del ciclo celular : M, fase de mitotisis, S, fase de síntesis de DNA, y G1 y G2 representan los periodos de comunicación entre las fases S y M. En la figura se indica el tiempo aproximado de cada fase para un ciclo de unas 24 h.

Los estudios pioneros llevados a cabo por Masui y Smith postularon la existencia de un factor promotor de la mitosis (MPF), un factor clave para regular el inicio de la mitosis en las células eucariotas (Masui and Markert, 1971; Smith and Gokcen, 1971). Estudios en levaduras identificaron a la quinasa Cdc2 como un elemento clave para la entrada en Mitosis (Nurse, 1975). Posteriormente, el grupo de T. Hunt identificó a las ciclinas como reguladores del ciclo celular mediante su unión a quinasas dependientes de ciclinas (Cdk) (Evans et al., 1983). La conexión bioquímica entre Cdks y ciclinas tuvo lugar en 1989 cuando se describió la asociación de la Cdk1 con ciclina A y B en Oocitos de "*Xenopus laevis*" y en la estrella de mar (revisado en Murray, 2004).

En 2001 los investigadores L.H. Hartwell, T. Hunt y P. Nurse recibieron el premio Nobel de Medicina por sus estudios sobre el ciclo celular y los elementos que lo regulan.

1.1.2 Cdks y Ciclinas

La progresión del ciclo celular en las células eucariotas, está determinada por las actividades de los complejos formados por ciclinas y quinasas dependientes de ciclina (Cdk) (Murray, 2004). Las Cdks son las subunidades catalíticas del complejo y forman parte de una gran familia de proteínas heterodiméricas Ser/Thr quinasas, cuyos miembros mejor caracterizados participan en el control del ciclo celular. De acuerdo con las últimas versiones del genoma humano y de ratón, hay 11 genes que codifican para Cdks y 9 genes que codifican para proteínas "Cdk-like" con una gran homología en su estructura primaria (Malumbres and Barbacid, 2005) (fig 1.2). La actividad catalítica de estas Cdks necesita de la unión de una subunidad reguladora (ciclina), por lo que el término Cdk es a menudo usado para el complejo heterodimérico activo. No todas los Cdks requieren para su regulación la unión a ciclinas, pero sí la gran mayoría. Finalmente, cabe señalar que el papel fisiológico de muchas de estas Cdks y sus correspondientes patrones de activación no han sido aun descritos. En 1991 se unificó la nomenclatura de la familia de quinasas dependientes de ciclinas. Cdc2 fue renombrado Cdk1, PSK-J3 como Cdk4, PSSALRE y PLSTIRE como Cdk5 y Cdk6 respectivamente. En los años sucesivos fueron clonadas y caracterizadas otros miembros de la familia: Cdk7, Cdk8, Cdk9, Cdk10 y Cdk11 (revisado en Denicourt and Dowdy, 2004; Malumbres and Barbacid, 2005; Malumbres and Carnero, 2003) (fig 1.2 a).

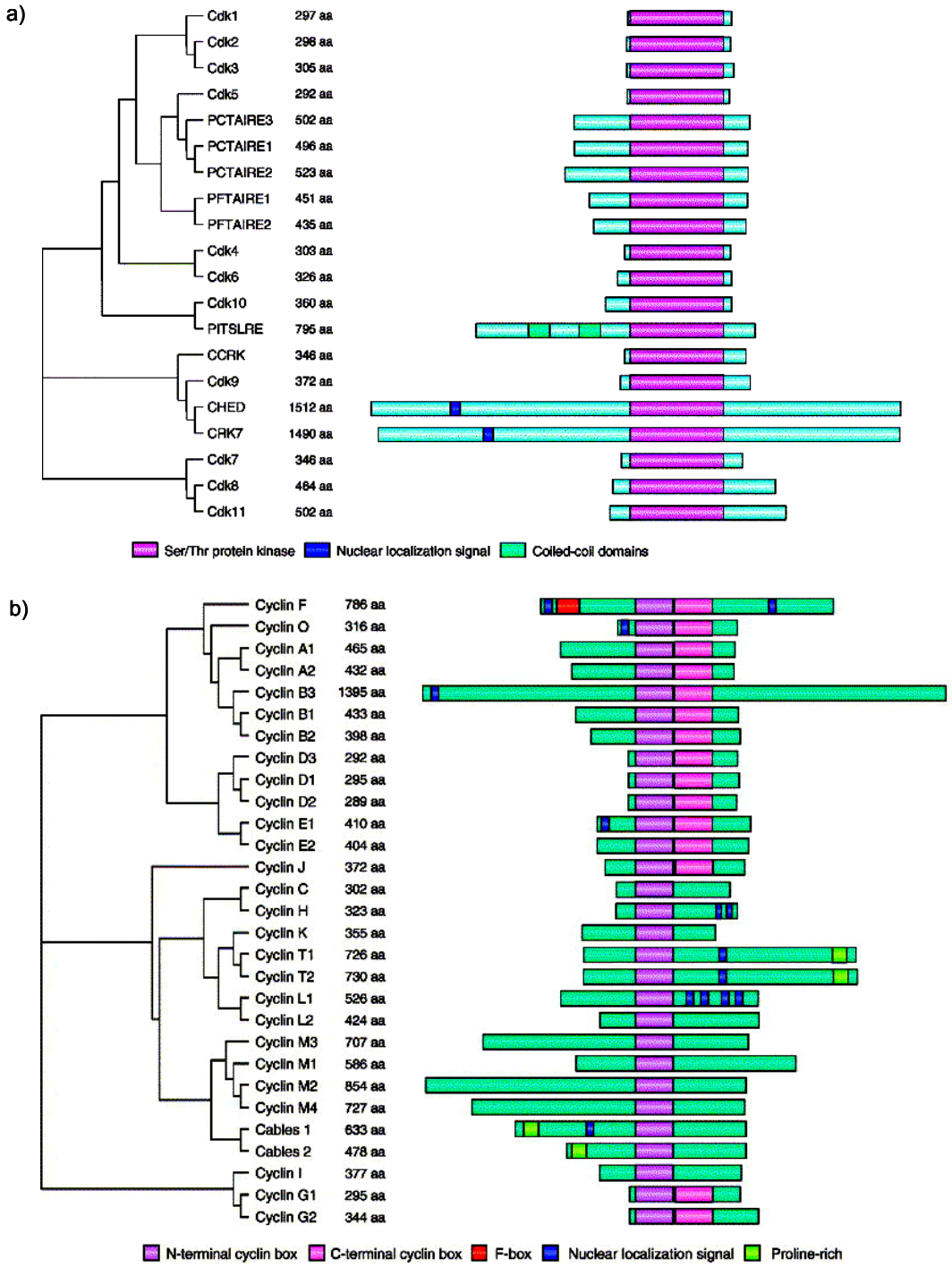


Fig 1.2 Familias de Cdks (a) **y Ciclinas** (b) **en mamíferos** (Malumbres M et al., 2005).

Estudios independientes permitieron identificar a las ciclinas como moléculas que se sintetizan y se degradan a lo largo del todo el ciclo celular (Evans et al., 1983) (Hunt, 1989). Las primeras ciclinas en ser descritas fueron Cdc13, Cln y ciclina B que fueron aisladas de *S.pombe*, *S.cerevisae* y células humanas, respectivamente. Posteriormente se descubrió la unión de ciclina A y ciclina B a Cdk1 (Nurse, 1990) y en estudios adicionales en mamíferos fueron identificadas la ciclina C, ciclina D y ciclina E. Recientemente, tras el análisis del genoma humano se han identificado 29 genes que presentan los 150 residuos de aminoácidos de la denominada "cyclin-box". Este dominio está formado por regiones de 5 hélices alfa y es responsable de la unión a las distintas proteínas, incluidas las Cdks. Todas estas proteínas se designan genéricamente como ciclinas, pero muchas de ellas son funcionalmente desconocidas (revisado en Malumbres and Barbacid, 2005; Massague, 2004; Sherr and Roberts, 2004) (fig 1.2.b).

Las quinasas Cdks son responsables de la progresión a través de las distintas fases del ciclo celular: G1 (Cdk4, Cdk6), G1-S (Cdk2) y G2-M (Cdk1). Sin embargo, trabajos recientes han descrito que Cdk4, Cdk6 y Cdk2 no son esenciales para el transcurso del ciclo celular, aunque estas enzimas si pueden ser absolutamente necesarias para la proliferación de ciertas células especializadas y para la adecuada respuesta a mitógenos (Malumbres et al., 2004; Martin et al., 2005). Las quinasas Cdk4 y Cdk6 no son requeridas para la entrada en el ciclo celular en respuesta a señales mitogénicas (Malumbres et al., 2004). La quinasa Cdk2 tampoco es necesaria para el ciclo celular mitótico o para mediar las actividades inhibitorias y supresoras de tumores de los inhibidores de ciclo celular p21 y p27 (Martin et al., 2005).

La regulación de los complejos ciclina-Cdks tiene lugar en varios niveles incluyendo: a) la unión a ciclinas a las subunidades Cdks, b) la inhibición y la activación por fosforilación y defosforilación de determinados residuos de las Cdks y c) la asociación de los complejos ciclinas-Cdk con los inhibidores CKI. La unión de los complejos ciclina-Cdk a la familia de proteínas CKI supone un proceso inhibitorio en la progresión del ciclo celular (ver apartado 1.1.4).

1.1.3 Progresión del ciclo celular

La progresión a través del ciclo celular se produce mediante la activación secuencial de distintos complejos ciclina-Cdk (fig 1.3).

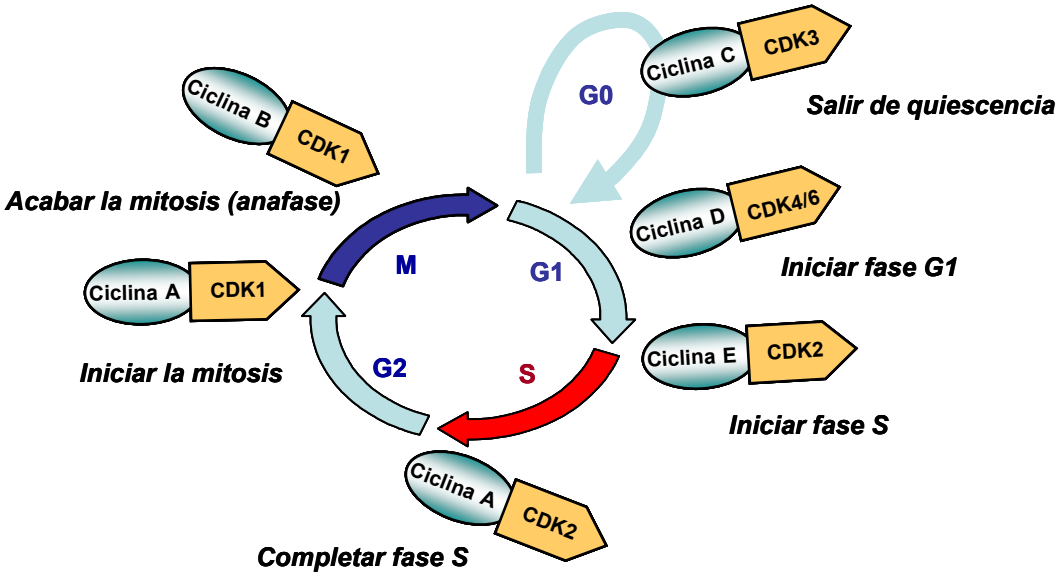


Fig 1.3 Activación secuencial de los complejos Ciclina-Cdks durante las fases del ciclo celular en mamíferos. Activación secuencial de los complejos Cdks tras la unión de sus correspondientes ciclinas en cada fase del ciclo celular. Go es la fase de quiescencia en la que se encuentran las células antes de entrar en el ciclo celular.

Para que una célula quiescente entre en el ciclo celular se requieren señales mitogénicas. Los genes que codifican para las ciclinas tipo D (D1, D2 y D3) (Matsushime et al., 1991; Won et al., 1992) se inducen en respuesta a dichas señales mitogénicas y las ciclinas se unirán a sus respectivas parejas catalíticas que son Cdk4 y Cdk6 (Sherr and Roberts, 1995) (fig 1.3). Estos complejos activos permiten a las células progresar a través de la fase G1 (Bates et al., 1994; Matsushime et al., 1992). El patrón de expresión de las ciclinas D varía mucho con el tipo celular, aunque la ciclina D1 es la más ampliamente expresada y estudiada (Hanna et al., 1993; Inaba et al., 1992; Xiong et al., 1992).

Se han generado los ratones “knock-out” para cada una de estas ciclinas, siendo viables cada uno de ellos. Sin embargo, los ratones dobles o triples “knock-out” de las

ciclinas D presentan letalidad embrionaria (revisado en Sherr and Roberts, 2004). El máximo de expresión de las ciclinas tipo D se produce en la fase G1, y su expresión permanece constante a lo largo del ciclo celular, siempre que se mantengan las señales extracelulares. Sin embargo, las células quiescentes no expresan ciclinas tipo D (Bakiri et al., 2000) (fig 1.4).

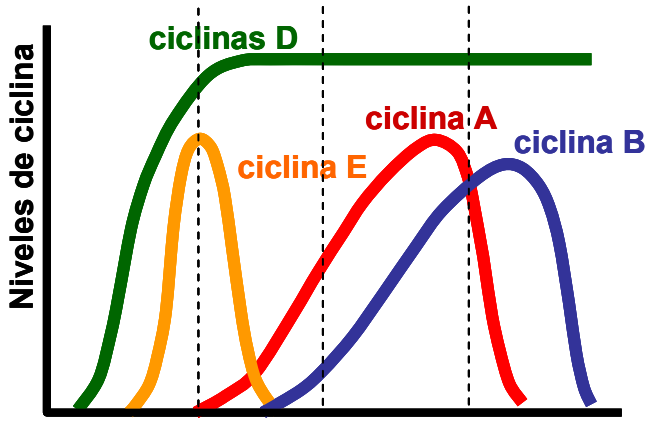


Fig 1.4 Identificación de las ciclinas como proteínas que se acumulan y se degradan rápidamente en distintas fases del ciclo (Hunt T et al., 1983).

Las ciclinas tipo D son de vida media corta ($t_{1/2}$ < 25 min). La retirada de los factores de crecimiento durante la fase G1 impedirá su acumulación y ello se correlaciona con el bloqueo del ciclo antes del llamado punto de restricción "R". A diferencia de las ciclinas tipo D, cuya regulación esta mediada por señales extracelulares, la expresión de otras ciclinas como la ciclina E, A y B es periódica (Sherr and Roberts, 1995). Los Cdk4 y Cdk6 se encuentran en exceso en la célula con respecto a las ciclinas tipo D, incluso durante el momento de mayor expresión de estas ciclinas que tienen lugar, tras la inducción con mitógenos. Por lo tanto, son las ciclinas tipo D las que actúan como factor limitante para la formación de complejos activos con Cdk4 y Cdk6 (Cheng et al., 1999; Matsushime et al., 1994).

Una vez se ha producido el ensamblaje de los complejos Cdk-ciclina D estos entran en el núcleo de la célula y allí deben ser fosforilados en un residuo de Thr por las quinasas activadoras de Cdk (CAK) para adquirir su actividad catalítica y fosforilar a sus sustratos (Kato et al., 1994). El principal sustrato de estos complejos es la proteína del retinobastoma (Rb) y sus proteínas relacionadas p107 y p130 (Beijersbergen and

Bernards, 1996; Kato et al., 1994; Xiao et al., 1996). Las quinasas dependientes de ciclinas D (Cdk4 y Cdk6) presentan elevada especificidad de sustrato, ya que fosforilan el extremo carboxilo terminal de Rb, pero no a otros sustratos más genéricos de las Cdk como la histona H1 (Matsushime et al., 1992). Está generalmente aceptado que las quinasas dependientes de ciclinas D inician el proceso de fosforilación de Rb (fig 1.5), mientras que las quinasas dependientes de ciclina tipo A y tipo B mantienen el estado de hiperfosforilación en Rb en las fases siguientes a G1 fosforilando a Rb en distintos sitios a los complejos ciclina D/Cdk4-6 (Sherr and Roberts, 1999).

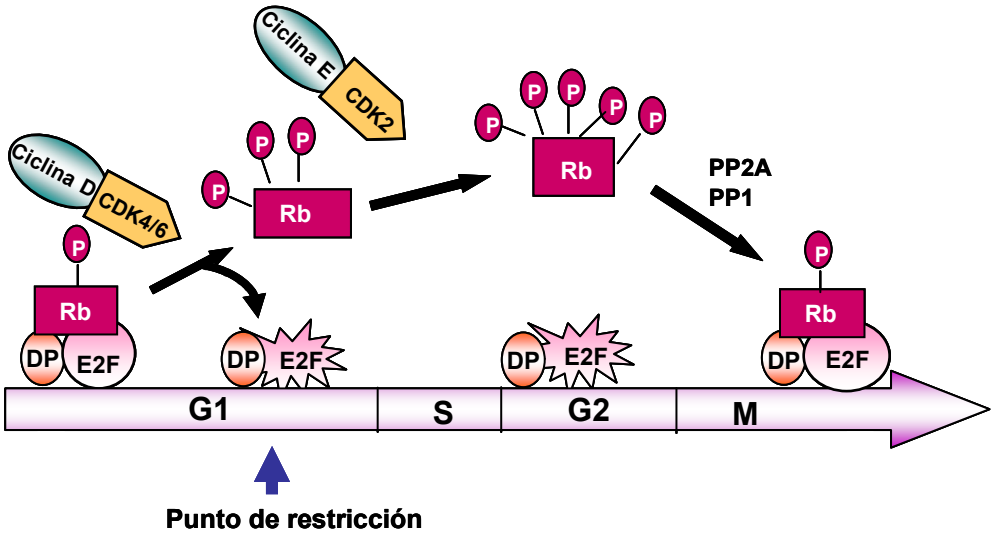


Fig 1.5 Control del punto de restricción R. La transición de la fase G1 a S está controlada por la activación secuencial de los complejos Cdk4/6-Ciclinas D y Cdk2-Ciclina E. Se libera el factor de transcripción E2F/DP de su inhibidor fosforilado Rb, y se activa la transcripción de genes para la transición hacia la fase S del ciclo celular.

Rb interacciona con histona deacetilasas (HDACs) y con los complejos remodeladores de la cromatina hBRM y BRG1 (Dunaief et al., 1994; Strober et al., 1996). Por lo tanto, el reclutamiento de complejos E2F/Rb a los promotores, antagoniza la expresión de genes diana de complejos E2F mediante procesos de acetilación de histonas y remodelación de la cromatina (Brehm et al., 1998; Magnaghi-Jaulin et al., 1998). La fosforilación que sufre Rb permite su disociación con el complejo Rb-histona desacetilasa (HDAC), y de esta manera se bloquea la actividad represora de la transcripción ejercida por la HDAC, lo que permitirá la activación de genes cuyas actividades están relacionadas con la síntesis de DNA. Así, la fosforilación de Rb

permitirá la liberación de factores de transcripción como son los miembros de la familia E2F, activan un conjuto de genes cuyos productos son requeridos para el metabolismo del DNA (Trimarchi and Lees, 2002; Wu et al., 1995) (fig 1.5). Unos de los más destacados genes activados transcripcionalmente tras liberar el complejo Rb-E2F son los genes de las ciclinas E (Botz et al., 1996; Geng et al., 1996). Estas se unen y activan a la Cdk2 y así se completa la salida de la fase G1 (Harbour et al., 1999) (fig 1.3).

Las ciclinas D y las Cdk4-6 son importantes para el control de la fase G1, pero no son estrictamente necesarias para que la célula progrese a la fase S. Este resultado se obtuvo a partir de las células de los ratones “knock-out” (Kozar et al., 2004; Malumbres and Barbacid, 2005).

Una vez bloqueada la actividad represora de Rb las células superan el punto de restricción “R” (fig 1.5), definido como el paso en G1 a partir del cual las células no requieren de estímulos mitogénicos para continuar el ciclo celular. En células quiescentes, las proteínas de la familia Rb se encuentran hipofosforiladas y unidas a factores de transcripción E2F, inhibiendo su actividad (Ikeda et al., 1996; Moberg et al., 1996). Las células “knock-out” en pRb, p107, p130 no tienen este punto de restricción y las células pueden dividirse en ausencia de mitógenos (Dannenberg et al., 2000; Sage et al., 2000).

Las siguientes ciclinas en participar en la progresión de la fase G1, son las ciclinas E (existen dos isoformas, E1 y E2). Tras su unión a Cdk2, el complejo formado por Cdk2-ciclina E continúa fosforilando a la proteína Rb en sitios diferentes a la de los complejos Cdk4-6/ciclina D, lo que sugiere que los mecanismos de inactivación de los complejos Cdk2-ciclina E son distintos de los de Cdk4/6-ciclina D (fig 1.5), y sus acciones podrían ser complementarias y no estrictamente redundantes (Sherr and Roberts, 2004). Además la actividad Cdk2-ciclina E contribuye a crear un “feedback” positivo entre la síntesis de ciclina E y la fosforilación de Rb, lo que contribuye de manera irreversible a la transición G1/S. Sus funciones no están estrictamente limitadas a la transición de G1, sino que existe otros sustratos que son fosforilados por las quinasas Cdk2-ciclina E, como son proteínas involucradas en la modificación de histonas, en la replicación y, en la reparación del DNA, en la duplicación del centrosoma y en su maduración (Yu and Sicinski, 2004). Una vez que las células entran en la fase S, el complejo Cdk2-ciclina E necesita ser silenciado para evitar la re-replicación del DNA (Hwang and Clurman, 2005; Resnitzky et al., 1994; Wimmel et al., 1994). La ciclina E finalmente será degradada por el

sistema SCF-ubiquitin ligasa (Clurman et al., 1996; Nakayama et al., 2000; Singer et al., 1999).

Al igual que lo descrito con los complejos Cdk4/6-ciclina D, las ciclinas E y la Cdk2 son importantes para la regulación del ciclo celular, pero no son estrictamente necesarias, ya que ratones de “knock-out” para las ciclinas E (Geng et al., 2003; Parisi et al., 2003) y para Cdk2 (Berthet et al., 2003; Ortega et al., 2003) eran viables y las células derivadas de los mismos proliferaban en cultivo. Sólo los ratones doble “knock-out” para las ciclinas E1 y E2 presentan letalidad embrionaria (Geng et al., 2003; Parisi et al., 2003).

La inactivación de Rb también promueve la activación de otros genes necesarios en las siguientes fases del ciclo celular, como son los que codifican para la ciclina A y ciclina B. Aunque la ciclina A se acumula en la fase S, la síntesis de ciclina B no es evidente hasta la transición G2-M. La ciclina A (A1 y A2) también forma complejos con Cdk2 (fig 1.3) y en menor medida con Cdk1 (Elledge et al., 1992; Pines and Hunter, 1990; Tsai et al., 1991). La ciclina A2 parece ser más ubicua, mientras que la ciclina A1 se expresa principalmente en células germinales. Los complejos Cdk2-ciclina A fosforilan numerosas proteínas que son necesarias para completar adecuadamente la fase S como son proteínas involucradas en la replicación del DNA (Cdc6) (Petersen et al., 1999), en la reparación del DNA (BRAC1), en la modificación de histonas (HIRA) (Hall et al., 2001; Magnaghi et al., 1998), así como proteínas que median proteolisis mediante ubiquitilación (Cdc20 y Skp2) (Ohtoshi et al., 2000; Yam et al., 1999) y otras que participan en otros puntos control de ciclo celular (p53, MDM2 , $p21^{Cip1}$) (Sherr and Roberts, 1999).

Al final de la fase S, las ciclinas tipo A se asocian con Cdk1. Los complejos Cdk2-ciclina A y Cdk1-ciclina A (fig 1.3) comparten varios sustratos como son proteínas que participan en la replicación del DNA y en el control de la progresión del ciclo celular. En la fase G2, las ciclinas A comienzan a ser degradadas mediante proteólisis mediada por ubiquitilación (Lisztwan et al., 1998; Michel and Xiong, 1998), mientras que las ciclinas B empiezan a ser sintetizadas activamente (fig 1.4). Las ciclinas B (B1 y B2) forman complejos activos con Cdk1 (fig 1.3), que regulan distintos eventos a lo largo de la transición G2-M y en la progresión a través de la mitosis. Estos complejos pueden llegar a fosforilar a más de 70 proteínas en mamíferos (revisado en Malumbres and Barbacid, 2005), por lo que está involucrados en numerosos procesos regulatorios y estructurales como la condensación cromosómica por la fosforilación de histonas (Carlson et al., 2001), la interrupción de la lamina nuclear por fosforilación de diferentes laminas como la lamina

B, proteínas de unión a microtúbulos, MAP-4, proteínas de unión al centrosoma, Eg5 (Blangy et al., 1995; Dessev et al., 1991; Eggert et al., 1993; Endl and Gerdes, 2000; Keryer et al., 1995; Macaulay et al., 1995; Ookata et al., 1995; Peter et al., 1990a; Peter et al., 1990b). Por otra parte, los complejos Cdk1-ciclina B también fosforilan proteínas implicadas en la replicación al fosforilar a proteínas como MCM4 (minichromosome maintenance protein-4) (Hendrickson et al., 1996) y proteínas como la subunidad TFIIH de la RNA polimerasa II y la proteína ribosomal S6 que participan en el proceso de iniciación de la transcripción que tiene lugar durante la mitosis (Long et al., 1998; Papst et al., 1998). Finalmente, para la salida de la fase de mitosis es necesaria la inactivación de los complejos Cdk1-ciclina B. Esta inactivación se produce por la degradación de la ciclina B vía ubiquitilación y regulada por el complejo promotor de la anafase (APC) (revisado en Harper et al., 2002).

1.1.4 Inhibidores del ciclo celular CKI: familias INK y Cip

Los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas o CKI están divididos en dos familias: INK4 y Cip/Kip (Sherr and Roberts, 1999). Las dos familias de CKI han sido caracterizadas en función de su interacción con las Cdks. Los miembros de la familia INK4 que incluyen p15 (INK4b), p16 (INK4a), p18 (INK4c) y p19 (INK4d), inhiben específicamente la actividad de Cdk4 y Cdk6, mientras que la familia Cip/Kip, formada por p21 Waf1/Cip1 (CDKN1A), p27 Kip1(CDKN1B) y p57 Kip2 (CDKN1C), inhiben un amplio número de complejos Cdk presentando afinidades distintas por cada uno de estos complejos (el-Deiry et al., 1993; Gu et al., 1993; Harper et al., 1993; Hunter, 1993; Sherr and Roberts, 1999). Los inhibidores Cip/Kip se unen a complejos formados por Cdk-Ciclina (Harper et al., 1993; Polyak et al., 1994) (Lee et al., 1995) (Harper et al., 1993), mientras que los inhibidores INK4 realizan su función uniéndose a monómeros de Cdk (Pavletich, 1999).

La identificación de los miembros de la familia INK4 tuvo lugar tras la localización del gen supresor de tumores MTS1 (múltiple tumor supresor 1) en el cromosoma humano 9p21 (Kamb et al., 1994), que codifica la proteína p16INK4a originalmente descrita como una proteína inhibidora de ciclo celular (Serrano et al., 1993). p16INK4 es el prototipo de toda la familia de INK4; análisis posteriores determinaron la existencia de un segundo MTS2 (multiple tumor suppressor 2) que codifica otro miembro de la familia, p15INK4b (Hannon and Beach, 1994). Posteriormente se describieron p18INK4c y p19INK4d (Chan

et al., 1995; Guan et al., 1994). Los cuatros miembros de esta familia comparten un dominio estructural que son las repeticiones de ankirina, parejas de hélices α antiparalelas y conectadas por una serie de lazos. (Pavletich, 1999). Este dominio es el responsable de la interacción con Cdk4 y Cdk6 y, tras la unión de los inhibidores INK4, las ciclinas D no pueden unirse y se reduce la afinidad de estas Cdks por el ATP (Pavletich, 1999). La expresión ectópica de estos inhibidores detiene el ciclo celular en la fase G1 en presencia de proteína Rb funcional (Bruce et al., 2000).

Actualmente, se sabe que los tres miembros de la familia Cip/Kip se unen y bloquean la actividad de todos los complejos Ciclina/Cdk in vitro, pero fundamentalmente inhiben a los complejos reguladores de fase G1 y, sobre todo, a los formados por la Cdk2 (-ciclina A y -ciclina E) (Harper et al., 1993; Sherr and Roberts, 1995; Xiong et al., 1993). Los tres miembros presentan un dominio de unión a Cdks en su región amino terminal.

Aunque hay cierta controversia, p21 y p27 parecen actuar como activadores de la actividad de los complejos ciclina D-Cdk4, e inhibidores de la actividad Cdk2 (Lee and Yang, 2001) (fig 1.6).

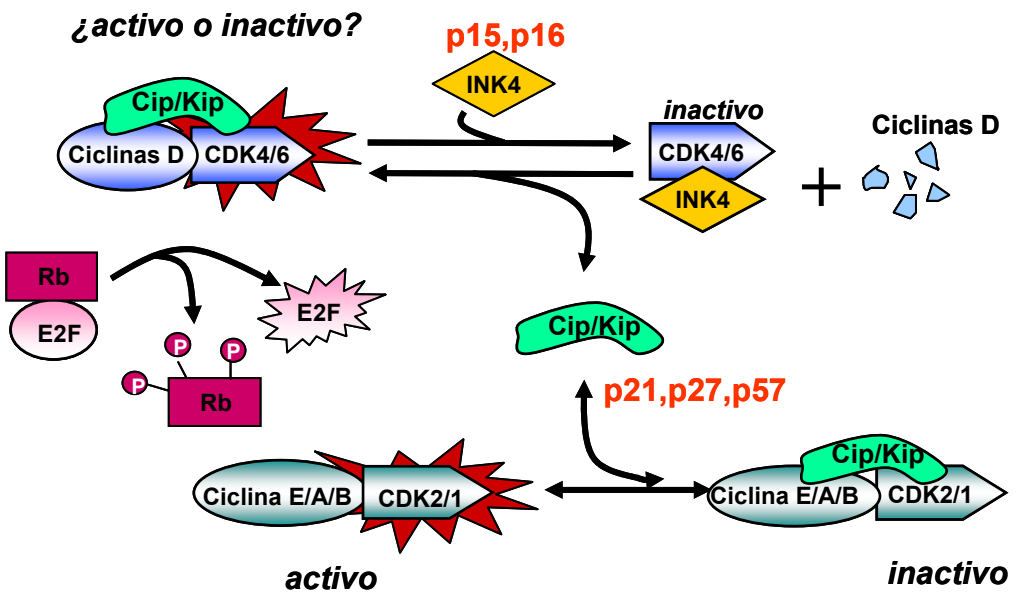


Fig 1.6 Actividad de los CKIs. Las proteínas de la familia INK se unen e inactivan a los complejos formados por CdK4/6-ciclinas D. Esta unión desplaza a las proteínas de la familia Cip/kip hacia los complejos Cdk2-ciclina E/A/B que también quedan inactivados. La consecuencia es la parada del ciclo celular.

p21 y p27 facilitan el ensamblaje de los complejos ciclina D1-Cdk4 en el citoplasma y ello promueve la estabilidad y la localización nuclear de la ciclina D1 (Cheng et al., 1999)(Coqueret et al., 2003). Sin embargo, cabe destacar que ausencia de p21 y p27 se han detectado bajos niveles de la ciclina D1 en el núcleo, sugiriendo que p21 y p27 podrían estar facilitando la importación nuclear de las ciclinas D1 (Cheng et al., 1999) funcionando como proteínas mediadoras en la comunicación entre el citoplasma y el núcleo. De esta manera los complejos Cdk4/6-ciclina D secuestran a las proteínas Cip/Kip, y los complejos Cdk2-Ciclina E pueden formarse.

1.2 La proteína inhibidora de quinasa dependiente de ciclinas $p21^{Cip1}$

La proteína p21 fue originalmente descrita por distintos grupos, como mediador de la parada celular inducida por p53 ($p21^{WAF1}$) (el-Deiry et al., 1993), como inhibidor directo de la actividad Cdk ($p21^{CIP1}$) (Gu et al., 1993; Harper et al., 1993; Xiong et al., 1993), un gen cuya expresión está aumentada en el proceso de senescencia celular (SD1) (Noda et al., 1994) y como mediador de la diferenciación promielocítica (mda6) (Jiang et al., 1994). Esta proteína pertenece a la ya mencionada familia Cip/Kip, (p21 Waf1/Cip1, p27 Kip1 y p57 Kip2) inhibidoras de quinasas dependientes de ciclinas (fig 1.7). Ha sido caracterizada por su papel inhibitorio en la progresión de la fase G1 del ciclo celular en respuesta a daño a DNA (Sherr and Roberts, 1999), además de su papel inhibitorio en la transición de las fases G2/M (Bunz et al., 1998).

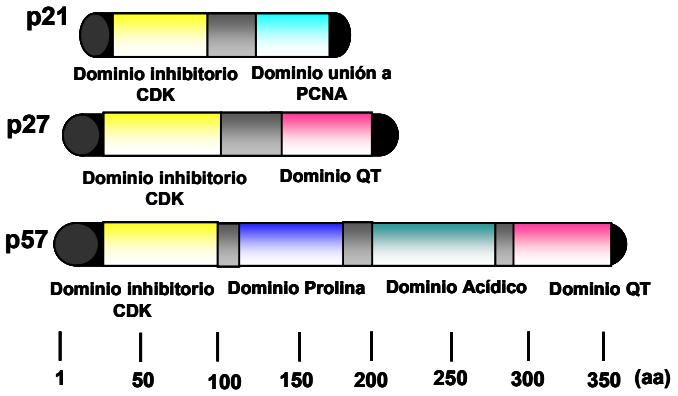


Fig 1.7 Dominios estructurales de los inhibidores de la familia Cip/Kip. Los tres miembros de la familia comparten el dominio de unión a Cdk en su región amino terminal. p27 y p57 comparten homología en su región carboxilo terminal, dominio QT, de función desconocida (modificada de Nakayama K., et al 1998).

1.2.1 Estructura de p21

El gen humano CDKN1A (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A) localizado en el cromosoma 6p21.2 (el-Deiry et al., 1994; el-Deiry et al., 1993) genera un transcrito de 2.1 kb que codifica para la proteína p21 de 164 aminoácidos. El gen CDKN1A contiene tres exones de 58, 450 y 1600 pb (fig 1.8) (el-Deiry et al., 1993; Harper et al., 1993).

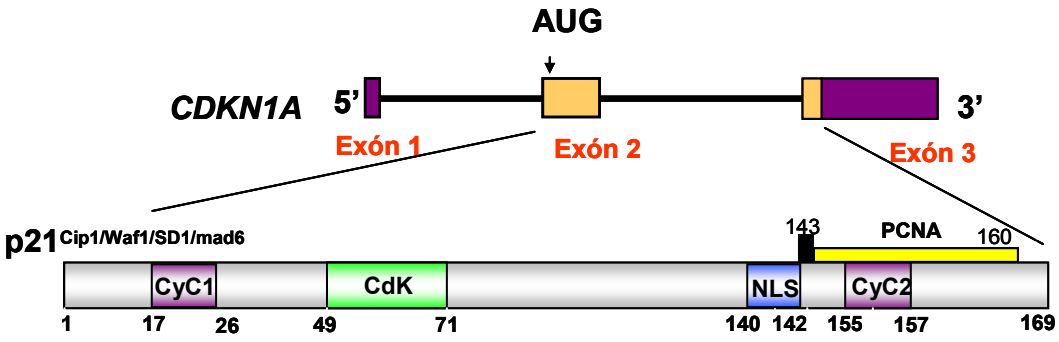


Fig 1.8 Estructura del gen humano CDKN1A y de su proteína p21. Cyc1 y Cyc2: sitios de unión a ciclina, Cdk: sitio de unión de Cdk, NLS: señal de localización nuclear. PCNA: antígeno nuclear de proliferación celular.

La secuencia de la proteína comparte un 70 % de identidad con la p21 de ratón, con dos regiones muy conservadas en los aminoácidos 21-60 (95 % de identidad) y aminoácidos 130-164 (89 % de identidad). La primera de estas regiones es rica en cisteinas y podrían formar dedos de zinc, mientras que la segunda región conservada contiene la secuencia de localización nuclear (Gartel et al., 1996). Todos los miembros de la familia Cip/Kip presentan una alta homología de secuencia en su dominio amino-terminal, siendo este dominio el que interacciona con los complejos ciclina-Cdk. El dominio de unión a las ciclinas "sitio ciclina 1" (aminoácidos A_{17}CRRLFGP_{24} en p21) comprende el motivo aminoacídico RXL. Este motivo también se puede observar en proteínas de la familia de Rb, el factor de transcripción E2F-1 y la fosfatasa Cdc25A que interaccionan con los complejos ciclina-Cdk. El motivo de unión a Cdk bloquea estéricamente el sitio de unión a ATP en las Cdk y ello impide la actividad catalítica (Russo et al., 1996). El dominio carboxilo terminal, a diferencia del amino terminal está

peor conservado en la familia CKI, siendo presumiblemente lo que les confiere diferentes funciones in vivo a cada uno de los miembros de la familia (fig 1.7).

Uno de los primeros papeles descritos en el dominio C-terminal para p21 fue su interacción con PCNA (Flores-Rozas et al., 1994; Waga et al., 1994) a través de los aminoácidos R_{143}-S_{160} (Pan et al., 1995; Warbrick et al., 1995). En 1996 fue elucidada la estructura tridimensional del complejo p21-PCNA y demostró la interacción entre ambas proteínas (Gulbis et al., 1996) (fig 1.9).

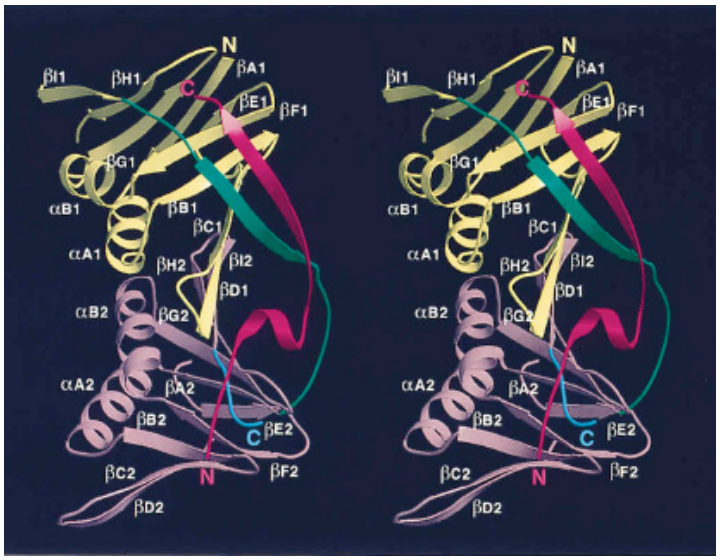


Fig 1.9 Diagrama de lazos del monómero PCNA unido al péptido p21Cip1. Diagrama de la estructura 3D de un monómero del complejo PCNA-p21, situado en la cara interna del anillo. El peptido p21 (color rosa) se extiende al lado del interdominio (color verde) que conecta los dos dominios de PCNA. El dominio N-terminal de PCNA se muestra en color amarillo y el dominio C-terminal en color violeta con cinco residuos azules en la parte azul (Gulbis MJ et al., 1996).

Dentro del dominio de unión a PCNA hay un segundo motivo, RXL capaz de unirse a las ciclinas ("sitio ciclina 2", aminoácidos $R_{155}RL_{157}$) (Chen et al., 1996). Este segundo sitio no lo presentan ni p27 ni p57. Este dominio C-terminal presenta también la señal de localización nuclear (aminoácidos $R_{140}KR_{142}$) (Rodriguez-Vilarrupla et al., 2002).

1.2.2 Funciones de p21

p21 es el miembro fundador de la familia Cip/Kip, efectores de la parada del ciclo celular (principalmente en fase G1) tras una amplia variedad de señales (Hengst et al., 1998; Sherr and Roberts, 1995). Las funciones de p21 no sólo están relacionadas con su papel como regulador del ciclo celular sino que existe una amplia bibliografía sobre otras funciones adscritas a p21. Se ha observado su papel en senescencia, diferenciación, apoptosis, citoquinesis, adhesión celular, crecimiento celular y endoreplicación, eventos todos ellos que pueden ser dependientes o independientes de p53 (revisado en (Chang et al., 2000b; Coqueret, 2003; Dotto, 2000; Roninson, 2002; Weiss and Randour, 2000)). p21, también ha sido caracterizado por su papel como cofactor transcripcional regulando la actividad de proteínas que se unen al DNA como NF-kB, Myc, E2F, STAT3 y el receptor de estrógenos (Coqueret, 2003; Fritah et al., 2005; Perkins, 2002). Más recientemente, se le ha atribuído un papel como represor transcripcional sobre Wnt4 (Devgan et al., 2005), Myc, Cdc25A (Vigneron et al., 2006) y sobre genes mitóticos, impidiendo así una segregación cromosómica inapropiada tras el daño al DNA (Chang et al., 2000a; Chang et al., 2000b).

1.2.2.1 p21 y control del ciclo celular

La proteína p21 se une directamente a Cdk1 (cdc2), Cdk2, Cdk3, Cdk4, Cdk6 (Dulic et al., 1994; Harper et al., 1993; Harper et al., 1995; Xiong et al., 1993; Zhang et al., 1993) y coprecipita con ellos en complejos activos formados con las ciclinas A, B, D y E, actuando como un potente inhibidor universal en inducir la parada del ciclo celular (el-Deiry et al., 1993; Harper et al., 1993; Harper et al., 1995; Noda et al., 1994; Xiong et al., 1993).

El papel de p21 para inhibir la actividad Cdk-ciclina parece estar en desacuerdo con la presencia de p21 en muchos de estos complejos. La conversión de complejos activos en inactivos se sugirió que era debido al cambio en el número de moléculas p21 unidas a los complejos Cdk-ciclinas. Así, los complejos activos contienen una sola molécula de p21, mientras que los inactivos presentan múltiples moléculas de p21 (Harper et al., 1995; Zhang et al., 1994a; Zhang et al., 1994b). Sin embargo, trabajos posteriores determinaron que una sola molécula de p21 era suficiente para inhibir los complejos Cdk2-ciclina A (Adkins and Lumb, 2000; Hengst et al., 1998). p21 facilita el

ensamblaje de los complejos Cdk4-ciclina D porque la unión a estos complejos les permite la entrada al núcleo (Cheng et al., 1999; Coqueret, 2003) y ello a su vez explicaría el incremento de los niveles de p21 después de la estimulación con mitógenos (LaBaer et al., 1997; Weiss and Randour, 2000). A su vez la unión de p21 a complejos Cdk4/6-ciclina D facilita la formación de complejos Cdk2 por desplazamiento de la proteína p21 (fig 1.6).

p21, independientemente de su unión a complejos ciclina-Cdk, se une por su dominio N-terminal con PCNA, sin afectar al ensamblaje de PCNA con polimerasa δ (Flores-Rozas et al., 1994; Waga et al., 1994). PCNA es una proteína accesoria de las principales enzimas de replicación del DNA como son la DNA polimerasa δ y la ε. La unión de p21 a PCNA parece impedir el movimiento de la pol- δ durante el proceso de elongación de la cadena de DNA e impide la unión a PCNA de otros componentes que forman parte del ensambalaje con la polimerasa (Gulbis et al., 1996). Sin embargo, p21 no inhibe a PCNA en la reparación del DNA. (Li et al., 1994a; Shivji et al., 1994) (fig 1.9). Estos procesos bloquean a las células en la fase G1 tras daño al DNA y son independientes del status de p53, pero no del Rb y de su fosforilación (Niculescu et al., 1998). En paralelo con estos datos, ha sido demostrado que p21 puede causar una represión específica en la transcripción medida por E2F, mediante su asociación directa con E2F por su dominio N-terminal (Delavaine and La Thangue, 1999; Shiyanov et al., 1996).

Una vez superada la fase S los niveles de proteína p21 comienzan a descender, pero es en la fase de transición G2/M donde p21 podría realizar una nueva parada del ciclo celular en respuesta a daño al DNA (Li et al., 1994b). Sin embargo, la parada en G2 por p21, no es imprescindible para el “checkpoint” en la fase G2 (Levedakou et al., 1995). Se ha propuesto esta parada en G2 como una pausa que induce p21 para permitir el ensamblaje del “checkpoint “en G2 antes de comenzar la mitosis. Aunque el mecanismo es menos obvio que el descrito en la parada en G1. p21 podría estar modulando la actividad de los complejos Cdk2-ciclina A y Cdk1-ciclina B1 tras inhibir la fosforilación en la Thr161 que activaría este complejo (Dulic et al., 1998; Niculescu et al., 1998; Smits et al., 2000). Alternativamente, p21 podría unirse a la ciclina B a través de CARB (Cip-1 associated regulador of ciclina B) (McShea et al., 2000). Otro mecanismo que potencia la parada en G2 por p21 es la inhibición de la transcripción de la topoisomerasa II, de ciclina B1, Cdk1 y de muchos otros genes necesarios para la mitosis, cuando se produce una inducción de p21 (Chang et al., 2000b).

1.2.2.2. p21 y apoptosis

Son muchos los estudios que sugieren el importante papel de p21 en la regulación de la muerte celular por apoptosis. Los agentes que causan daño en el DNA y el estrés oxidativo activan dos rutas. Una de ellas obedece a mecanismos de apoptosis dependientes de p53 y otra ruta es la activación de p21 dependiente de p53 que protegerá a las células de apoptosis. De manera similar, TGF-β, inhibidores de histona desacetilasa e IFN-γ inducen apoptosis y activación de p21, por mecanismos independientes de p53 que protegerá a las células de la apoptosis, (fig 1.10).

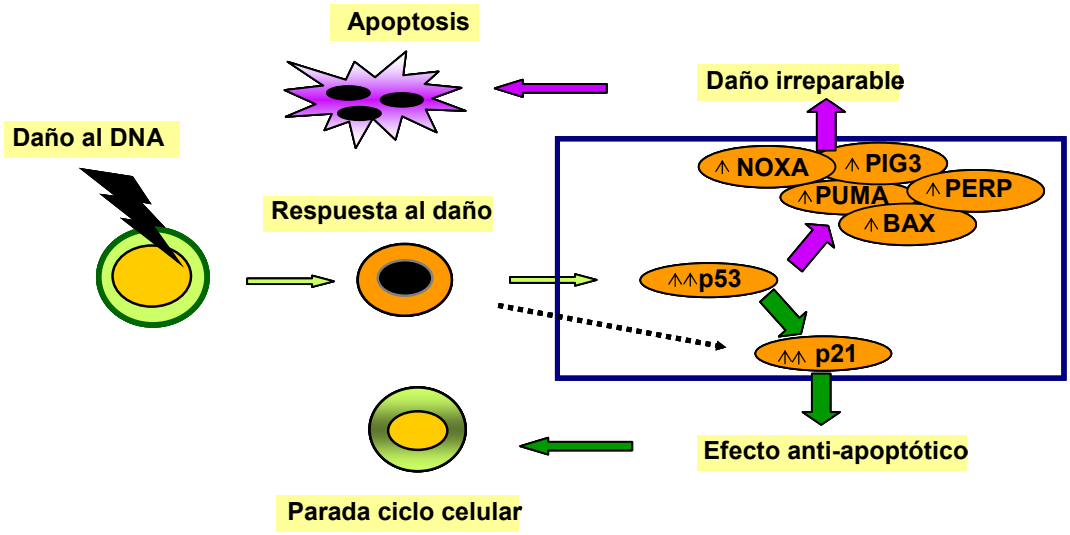


Fig 1.10 Papel de p21 en el destino final en respuesta a daño al DNA. La activación de p21 permite la supervivencia celular a través de procesos de reparación y parada de ciclo celular (modificada de Weiss RH et al., 2003).

Todavía hoy no está dilucidado el mecanismo por el que p21 protege a las células de apoptosis. Se ha propuesto que podría estar mediado por la inhibición del ciclo celular, principalmente la inhibición sobre los complejos Cdk2 (Harvey et al., 2000), o bien p21 podría mediar directamente el bloqueo de la apoptosis. p21 interacciona con proteínas pro-apoptóticas como la pro-caspasa 3 impidiendo su conversión y maduración, y a su vez bloqueando la ruta de apoptosis mediada por Fas (Suzuki et al., 1998; Suzuki et al., 1999). También, p21 inhibe quinasas que regulan la apoptosis como ASK1 (apoptosis

signalling regulation-kinase 1) y SAPKs (stress activate protein kinase) (Asada et al., 1999) y estabiliza a proteínas inhibidoras de apoptosis como c-IAP1 (inhibitor apoptosis protein) (Steinman and Johnson, 2000). La sobreexpresión de p21 bloquea con su dominio N-terminal al dominio citoplasmático del receptor TRAIL (Ligand induced apoptosis related Tumor necrosis (TNF))-DR4 que induce la rotura de la caspasa 8 (Xu and El-Deiry, 2000).

Sin embargo y paradójicamente, en algunos casos p21 promueve la apoptosis. El mecanismo por el que p21 promueve la apoptosis no está perfectamente descrito. La proteína p21 es sustrato de caspasa 3, sufriendo rotura proteolítica y el producto obtenido pierde su función anti-apoptótica. En algunos casos se ha descrito que el aumento de expresión de p21 promueve la expresión de proteínas pro-apoptóticas como Bax y receptores de muerte celular (Kang et al., 1999; Kitamura et al., 1999; Lincet et al., 2000). p21 es capaz de interaccionar y regular los componentes la maquinaria de reparación del DNA (revisado en (Gartel and Tyner, 2002)).

Uno de los modelo celulares donde mejor se ha estudiado los efectos de p21 en apoptosis ha sido en la línea celular derivada de cáncer colorectal HCT116 y en su derivada HCT116p21$^{-/-}$ (donde p21 está mutado por recombinación homologa Waldman et al., 1995). El papel anti-apoptótico de p21 fue estudiado con fármacos que causan daño al DNA como son la adriamicina, etopósido, 5-fluoracilo (Bunz et al., 1999; Chan et al., 2000; Chattopadhyay et al., 2001; Lu et al., 2000; Mahyar-Roemer and Roemer, 2001; Ravizza et al., 2004; Seoane et al., 2002), con paclitaxel (Giannakakou et al., 2001), en situación de hiperoxia (Helt et al., 2001; Staversky et al., 2006), con inhibidores de histona desacetilasa (Archer et al., 1998; Mahyar-Roemer and Roemer, 2001; Wagner and Roemer, 2005), e irradiación (Jung et al., 2003; Sohn et al., 2006; Wendt et al., 2006). En todos ellos se produce una aumento de la expresión p21 (vía dependiente e independiente de p53) que detiene el ciclo celular, mientras que las células deficientes en p21 sufren apoptosis, lo que sugiere el papel protector de p21 (Polyak et al., 1996).

Se ha discutido mucho sobre las funciones de p21 según su compartimentalización. En oposición al papel de p21 nuclear como anti-proliferativo, p21 puede tener papel como pro-proliferativo y de supervivencia celular en el citoplasma. La fosforilación de p21 por AKT causa estabilización y acumulación de p21 en el citoplasma (El-Deiry, 2001; Li et al., 2002; Zhou et al., 2001). Además, p21 facilita el ensamblaje y translocación al núcleo de los complejos ciclinas D-Cdk4/6 e impide su exportación nuclear (Alt et al., 2002; Cheng et al., 1999; LaBaer et al., 1997). p21 citoplasmática

interacciona con ASK1 y SAP (Asada et al., 1999) y ello inhibe sus actividades catalíticas pro-apoptóticas. Finalmente, p21 en el citoplasma interacciona con pro-caspasa 3 (Suzuki et al., 1999), e inhibe la activación de caspasa 3, bloqueando la apoptosis mediada por FAS. Esto sugiere que p21 puede adquirir funciones anti-apoptóticas de ganancia de función en el citoplasma (El-Deiry, 2001).

1.2.3 Regulación de p21

Son diferentes las señales que regulan la actividad de p21. El gen p21, no sólo responde a la activación transcripcional por p53, para el que presenta dos lugares de unión en su promotor (el-Deiry et al., 1993), sino que además presenta regulación independiente de p53 implicadas en diferenciación terminal y senescencia. La expresión de p21 puede ser inducida a través de activadores de transducción de señales como son los miembros de la familia STAT que se unen a la región del promotor de p21 (Bromberg and Darnell, 2000; Chin et al., 1996). Esta activación es inhibida por la metilación en la región promotora de p21 (Chen et al., 2000), lo que sugiere que la metilación (mediada por Dnmt3a) es uno de los mecanismos de silenciamiento de la expresión de p21. Otro inductor transcripcional de p21 es el factor anti-proliferativo TGF-β (Datto et al., 1995) (fig 1.11).

El factor de transcripción Myc reprime la expresión de p21, pero su mecanismo de represión es muy discutido. La región proximal del promotor alrededor de 100 pb es suficiente para está represión (Claassen and Hann, 2000; Gartel et al., 2001), y está en controversia si Myc se une directamente a esta región. Se ha demostrado que Myc inhibe la transcripción de p21: a) a través de la inhibición del factor de transcripción Sp1/Sp3 que induce la transcripción de p21 (Gartel and Shchors, 2003; Gartel et al., 2001) y b) a través de Miz-1 que se une a la secuencia iniciadora del promotor de p21 (Seoane et al., 2002). En nuestro laboratorio se describió el papel antagonista de Myc sobre la inducción de p21 mediada por Ras. Estos efectos era independientes de Miz-1 pero dependientes de Sp1 (Delgado et al., 2000; Vaque et al., 2005). Otro aspecto controvertido es el papel de la proteína Max. Mientras que es conocida la heterodimerización de Myc/Max para transactivar genes diana de Myc, no esta claro si Max es absolutamente necesario para la función represora de Myc. Existen estudios que determinaron que la sobre-expresión de Max mitigaba la represión de p21 por Myc (Brugarolas et al., 1999). Sin embargo,

estudios posteriores determinaron que Max era necesario para la represión dependiente de Myc (Mao et al., 2003)

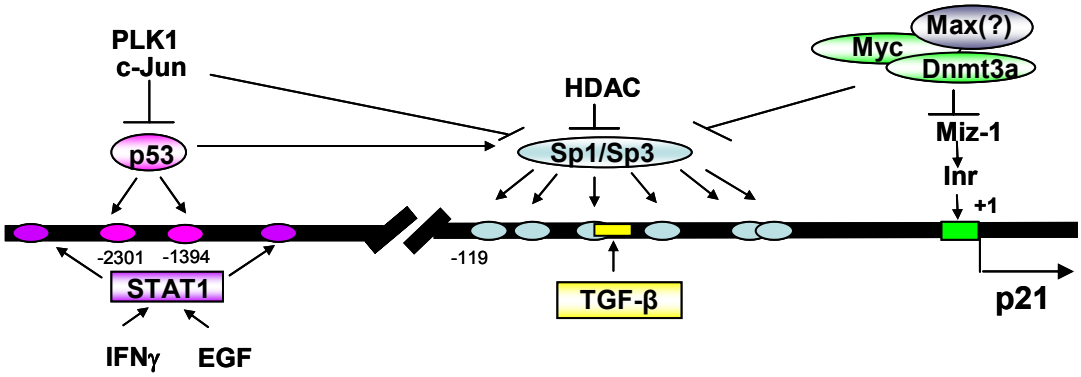


Fig 1.11. Múltiples factores participan en la inhibición del promotor de p21. Estos factores realizan su acción en la región próximal del promotor de p21. Algunos pueden unirse directamente al DNA, otros interfieren con reguladores positivos de la transcripción de p21 (modificada de Gartel AL et al., 2005).

Existe otro tipo de regulación a nivel de la proteína p21. Un regulador negativo es la proteína denominada SET, una oncoproteína que se une al dominio C-terminal y altera la actividad inhibitoria Cdk-ciclina, lo que sugiere que modula la transición G1/S. Esta unión no se produce en otro miembro de la misma familia Cip/Kip como es p27, lo que sugiere que es una unión especifica de p21 (Estanyol et al., 1999).

El oncogen HER2 también regula negativamente la actividad de p21 a través de AKT, que fosforila p21 en la Thr145 y ello conlleva la localización citoplasmática de la proteína y con ello la inhibición de su actividad anti-proliferativa (Zhou et al., 2001). Este fenómeno también se observa con una proteína de unión a Ca^{2+} como es la Calmodulina que se une a p21 y está implicada en la regulación de la localización nuclear de p21 (Agell et al., 2006; Rodriguez-Vilarrupla et al., 2005; Taules et al., 1999).

1.2.4 Degradación de la proteína p21

p21 es una proteína lábil con una vida media alrededor de 30 min, ubiquitilada in vivo y degradada por el proteosoma. Sin embargo, el papel de esta ubiquitilación es muy controvertido. Un estudio donde inhiben la ubiquitilación al mutar los residuos de lisina, determinó que esta ubiquitilación no estabiliza a la proteína (Sheaff et al., 2000). Otros trabajos describen que la ubiquitilación se produce en el dominio amino terminal y la

degradación de p21 tiene lugar en el proteosoma (Bloom et al., 2003). Trabajos más recientes, identificaron una nueva proteína WISPp39 que junto con la chaperona Hsp90 se une en la región amino-terminal de p21 e impiden su ubiquitilación; este complejo formado por WISP39 y Hsp90 es responsable del correcto plegamiento y estabilidad de la proteína (Jascur et al., 2005).

1.2.5 p21 y Cáncer

p21 parece tener un papel dual en cáncer, pudiendo actuar tanto como supresor como promotor de tumores. En los primeros estudios con “knock-out” en modelos murinos se observó que los ratones quedaban libres de tumores al menos hasta los siete meses de edad (Deng et al., 1995). Años más tarde se demostró que estos ratones deficientes en p21 desarrollaban tumores espontáneos en un tiempo promedio de 16 meses, mientras que los controles los desarrollaban al menos pasados los dos años. Los tumores que desarrollaban eran principalmente de origen hematopoyético y endotelial y, en menor porcentaje, epiteliales (Martin-Caballero et al., 2001). Se determinó que esta deficiencia en p21 incrementaba el índice de tumorogénesis en ratones heterocigotos para Rb (Brugarolas et al., 1998) o para APC (Yang et al., 2001b) o deficientes en p18INK4 (Franklin et al., 2000), así como en ratones con mutaciones en v-H-Ras. Estos estudios permitieron clasificar a p21 como una proteína con actividad supresora de tumores.

Sin embargo, la deficiencia de p21 reducía el desarrollo del tumor inducido por radiación en ratones deficientes en ATM (Wang et al., 1997) y en ratones control (Martin-Caballero et al., 2001). Además, ratones con deficiencia de p21 demostraron padecer una menor apoptosis en el epitelio del colon tras el tratamiento con el carcinógeno azoximetano (Poole et al., 2004a) respecto a los ratones control. El mismo resultado se obtuvo, en ratones dobles “knock-out” con inactivación genética de Muc2 (miembro de la familia de proteínas Mucina) y p21 (Yang et al., 2005). Estos datos sugirieron que la expresión de p21 en el epitelio del colon facilita la apoptosis tras el daño al DNA. Sin embargo, estos ratones con deficiencia de p21 no mostraban diferencias en la proliferación celular o en la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular, sugiriendo que el papel de p21 como supresor del ciclo celular no está correlacionado con su papel como estimulador de la apoptosis (Poole et al., 2004a). Por lo tanto, los

resultados con ratones deficientes en p21 en situaciones específicas parecen indicar que el papel de p21 podría ser más el de un oncogen que el de un supresor de tumores.

En relación con p21 y cáncer humano, son varias las mutaciones que se han descrito para la proteína p21 en cáncer (Bhatia et al., 1995; Gao et al., 1995) (Balbin et al., 1996; Malkowicz et al., 1996; Vidal et al., 1995) y algunas de estas mutaciones alteran la actividad de p21 como inhibidor de Cdk (Welcker et al., 1998). Sin embargo, la conclusión en conjunto de todos estos estudios es que las mutaciones de p21 en cáncer humano son extremadamente raras (McKenzie et al., 1997; Patino-Garcia et al., 1998; Shiohara et al., 1994) si se compara con otras halladas en otros supresores de tumores como son p53 y p16. La expresión de p21 es uno de los más prominentes marcadores funcionales de la actividad de p53 y muchos estudios describen que la pérdida o el silenciamiento de p21 se correlaciona con carcinogénesis y peor pronóstico. Este es el caso de los cánceres de vejiga invasivos (Korkolopoulou et al., 2000), cáncer de pulmón (Komiya et al., 1997), colorectal (Zirbes et al., 2000), cervical (Lu et al., 1998), cabeza y cuello (Kapranos et al., 2001). Tales correlaciones pueden ser más importantes cuando se relaciona la ausencia de p21 con la perdida de expresión de p53 (Anttila et al., 1999; Caffo et al., 1996; Ogawa et al., 2001). Sin embargo, en otros casos el incremento de expresión de p21 se asocia con la progresión tumoral y con peor pronóstico. Este es el caso de los cánceres de vejiga superficial (Korkolopoulou et al., 2000), cáncer de próstata (Aaltomaa et al., 1999; Baretton et al., 1999), ovario (Ferrandina et al., 2000), cervical (Bae et al., 2001; Cheung et al., 2001), mama (Ceccarelli et al., 2001), cabeza (Jung et al., 1995), donde el papel de p21 es como oncoproteína. El resultado de estos estudios es consistente con el papel dual de la proteína p21.

1.3 p53

La proteína p53 es el miembro más conocido de la familia formada por p53, p63 y p73. p53 fue identificado hace más de veinte años (1979) como una proteína que se asociaba con el antígeno del virus SV40 y causaba transformación oncogénica, de ahí que el gen p53 fuese considerado originalmente como un oncogen. Sin embargo, a lo largo de los años 80 se descubrió que ese gen estaba mutado, y p53 realmente es un oncosupresor (Bienz et al., 1984; Lane and Crawford, 1979; Linzer and Levine, 1979; Oren and Levine, 1983). Sus homólogos p73 y p63 y sus isoformas fueron caracterizadas

años después (Augustin et al., 1998; Kaghad et al., 1997; Osada et al., 1998; Schmale and Bamberger, 1997; Senoo et al., 1998; Trink et al., 1998; Yang et al., 1999).

p53 actúa fundamentalmente como un supresor de tumores. TP53 es el gen más comúnmente mutado en cáncer (el 50 % de los tumores humanos, http://.iarc.fr/p53), lo cual impide la correcta función de la proteína. Las mutaciones en la línea germinal predisponen a un amplio espectro de cánceres en estadío temprano (Síndrome de Li-Fraumeni) (Hainaut and Hollstein, 2000). Sin embargo, son raras las ocasiones en las que aparecen mutados los otros miembros de la familia, p63 y p73 (Olivier et al., 2002; Sunahara et al., 1998; Takahashi et al., 1998).

1.3.1 Estructura de p53

El gen TP53 está localizado en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13) y está bien conservado a lo largo de la evolución (Soussi et al., 1990). Se han descrito recientemente hasta nueve isoformas distintas (fig 1.12).

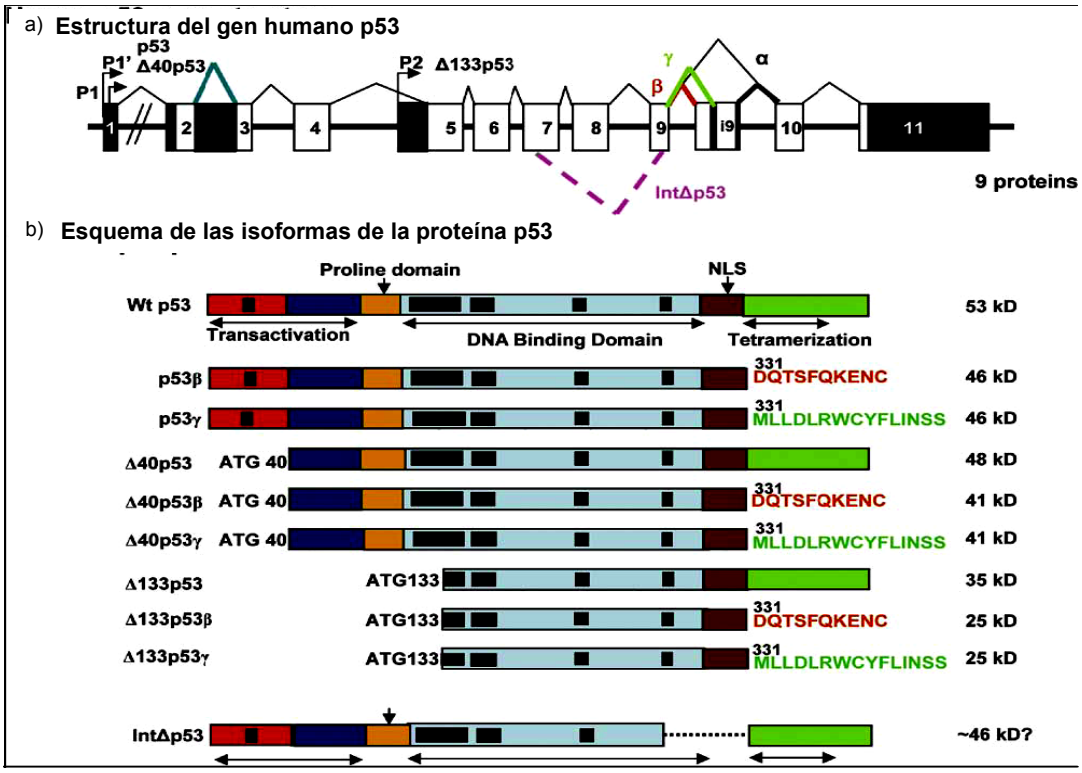


Fig 1.12. Esquema del gen humano p53 y de las isoformas de la proteína. a) Esquema de la estructura del gen p53. Las secuencias no codificantes en negro y secuencias codificantes en blanco. b) Esquema de las isoformas de la proteína p53 humana. Las proteínas p53, p53β, p53γ,Δ133p53, Δ133p53β y Δ133p53γ se obtienen por promotores alternativos en el intrón 4 y corte y empalme alternativo en el intrón 9. Δ40p53, Δ40p53β y Δ40p53γ se obtienen por corte y empalme alternativo del intrón 2 y un inicio de la traducción alternativo (Bourdon JC et al., 2005).

El conjunto de las isoformas incluyen: la forma completa de p53, tres dominios N-terminal que comienzan en los codones 1, 40 y 133 respectivamente y pueden combinarse con diferentes dominios C-terminal por una combinación de corte y empalme, y el uso de diferentes promotores transcripcionales (Bourdon et al., 2005).

La función de estas isoformas no está aun bien caracterizada. El gen humano Tp53 puede codificar para una proteína de 393 aminoácidos. La proteína p53 posee varios dominios con propiedades especificas (Prives and Hall, 1999): el dominio de transactivación (TAD; aminoácidos 1-42) está localizado en la región N-terminal de la proteína cercano a una región rica en prolina (aa 63-97); la secuencia específica de unión a DNA esta situada en la región central de la proteína (aa 102-292); el dominio C-terminal de la proteína que incluye una región flexible (aa 300-318), el dominio de oligomerización (aa 323-356) y una región básica (CTD, aa 363-393) (Prives and Hall, 1999) .

Las mutaciones de TP53 están a menudo asociadas a las regiones conservadas de los 4 dominios de la proteína, pero el mayor porcentaje de ellas aparece en la región de unión a DNA, donde el cambio de un aminoácido por otro interrumpe dicha unión (Petitjean et al., 2007a; Petitjean et al., 2007b) (fig 1.13).

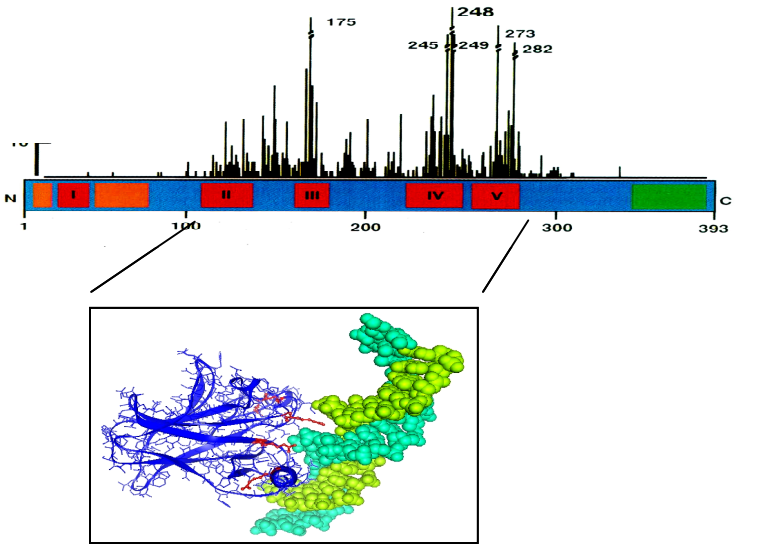


Fig 1.13. Mutaciones en la proteína p53. a) Frecuencia de mutaciones en los residuos aminoacídicos de la proteína p53. Las regiones en rojo representan las regiones más consevadas de la proteína p53, y donde más mutaciones existen. Muchas de ellas están localizadas en el dominio de unión a DNA. b) Estructura cristalina del dominio de unión a DNA de la proteína p53 (color azul) unido a DNA (color verde). Los residuos aminoacídicos más frecuentemente mutados se muestran en color rojo (Cho Y et al., 1994).

La mayoría de estas mutaciones son mutaciones de cambio de significado por sustitución de un nucleótido por otro diferente (“missense”) (75 %), otras son mutaciones que cambian el marco de lectura (“frameshift”) por delecciones o inserciones de nucleótidos (9 %). También existen mutaciones sin sentido (“nosense”), que dan lugar a una proteína truncada (7 %) y mutaciones silentes sin ningún efecto fenotípico (5 %) (Olivier et al., 2002) .

p53 existe predominantemente como tetrámero (dímero de dímero) al unirse al DNA y es la región C-terminal la responsable de esta tetramerización.

1.3.2 Modificaciones post-traduccionales de p53

p53 sufre distintas modificaciones post-traduccionales en respuesta a estrés genotóxico. El dominio N-terminal es principalmente fosforilado, mientras que el dominio C- terminal puede ser fosforilado, acetilado o sumoilado.

Son numerosos los sitios de fosforilación en los dominios amino y carboxilo terminal de la proteína p53, que incluyen las Ser3, 6, 9, 15, 20, 33, 37, 46, 315, 317, 378, 392 y tres residuos de Thr18, 55 y 81 (fig 1.14).

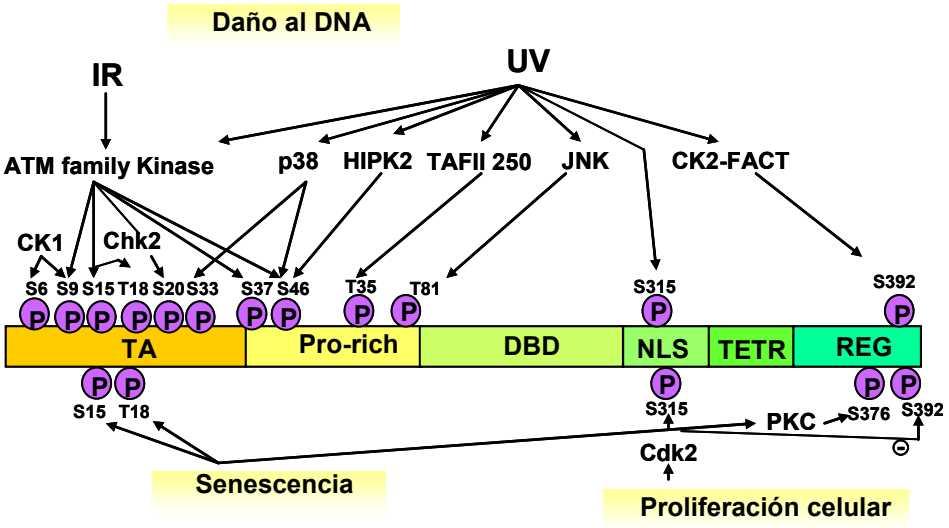


Fig 1.14. Fosforilación de la proteína humana p53 en condiciones de estrés genotóxico o durante la proliferación celular y la senescencia. La fosforilación de la Ser15 es necesaria para activar la fosforilación de la Thr18 después del daño a DNA. IR, radiación ionizante; UV, radiación ultravioleta; P,fosforilación; S, Serina; T,Threonina; ATM, Ataxia-telagiectasia Mutated; p38, p38 MAP kinase; HIPK2, homeodomain-interacting protein kinase 2; JNK, JUN-terminal kinase; CK1 y CKII, casein kinase 1 y 2; FACT, chromatin transcriptional elongation factor; CDK2, cyclin-dependent kinase 2; PKC, protein kinase C (modificada de Xu Y, et al .,2003).

Múltiples Ser/Thr quinasas están implicadas en las señalizaciones que desencadena la fosforilación de estos residuos en p53. Algunas de estas quinasas son: ATM, ATR, DNA-PK, ChK1, Chk2, CK1, p38, CDK2, PKC, JNK (fig 1.14), pero el mecanismo preciso por el que ocurren muchas de estas fosforilaciones es desconocido (revisado en (Jimenez et al., 1999; Ljungman, 2000; Xu, 2003)).

Sin embargo, otras como la fosforilación sobre la Ser15 y Ser20 han sido extensamente estudiadas. Estas fosforilaciones la realizan las quinasas ATM y ATR para Ser15 y ChK1 y Chk2 para Ser20. Existen estudios que determinan que la fosforilación de Ser20 impide la unión de MDM2 el principal regulador negativo de p53 y con ello aumenta la estabilidad de p53 (Chehab et al., 1999; Shieh et al., 1999; Unger et al., 1999). La fosforilación de Ser15 regula la unión de p53 con el cofactor transcripcional p300/CBP con actividad histona acetiltransferasa (Avantaggiati et al., 1997; Dumaz and Meek, 1999; Lambert et al., 1998) y a su vez dicha fosforilación impide la interacción MDM2-p53 (Shieh et al., 1997). Otros estudios demostraron que esta fosforilación podría estabilizar a la proteína e impedir su exportación nuclear (Zhang and Xiong, 2001), y que la fosforilación de Ser15 no impide la interacción MDM2-p53 (Avantaggiati et al., 1997; Dumaz and Meek, 1999; Lambert et al., 1998; Sakaguchi et al., 2000). Otra de las fosforilaciones que han sido muy estudiadas son las que afectan a los residuos Ser315 y Ser392, fosoforilados por los complejos Cdk2 y ChK2, respectivamente. Estas modificaciones regulan la oligomerización de p53 y ello determina la especificidad de unión al DNA. (Hao et al., 1996; Sakaguchi et al., 1997; Wang and Prives, 1995).

La acetilación de p53 tiene lugar en el dominio C-terminal sobre las Lys320, 372, 373, 381, 382 (fig 1.15) y los encargados de realizar esta acetilación son los cofactores PCAF y CBP/p300 que poseen actividad histona acetiltransferasa intrínseca (Gu and Roeder, 1997; Liu et al., 1999; Sakaguchi et al., 1998).

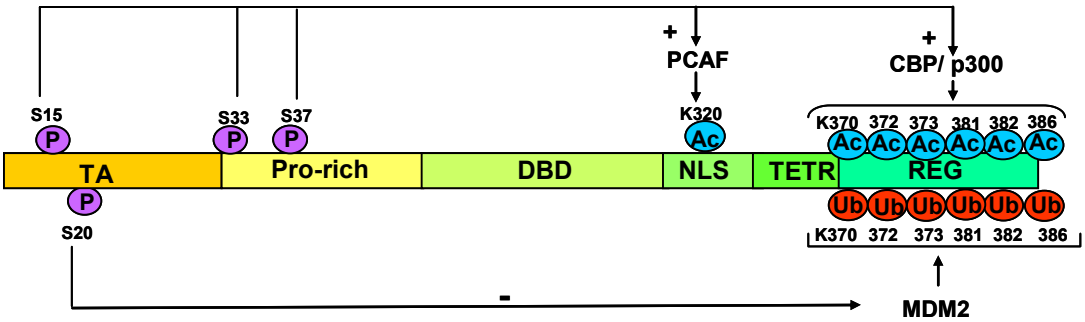


Fig 1.15. Interacción funcional entre fosforilación, acetilación y ubiquitilación de p53. La fosforilación de p53 en la Ser15, Ser33 y Ser 37 podría activar la acetilación de p53 por la interacción entre p53 y los coactivadores PCAF y CBP/p300. La fosforilación en la Ser20 podría interrumpir la interacción entre p53 y MDM2, inhibiéndose la ubiquitilación de p53. Los residuos de lisinas en el dominio C-terminal acetilados tras daño al DNA son también ubiquitilados por MDM2. P, fosforilación; Ac, acetilación; Ub, ubiquitilación (modificada de Xu Y, et al ., 2003).

Son varios los mecanismos descritos para la regulación de la acetilación de p53. Algunos trabajos proponen que la fosforilación de p53 en la Ser15 o Ser33/37 podría regular la interacción entre CBP/p300 y p53 (Dumaz and Meek, 1999; Sakaguchi et al., 1998). La interacción con MDM2 (que desestabiliza a p53 porque promueve su ubiquitilación) suprime la acetilación mediada por p300 (Kobet et al., 2000) (fig 1.15). Un tercer implicado en la acetilación de p53 es el supresor de tumores PML (proteína de la leucemia promielocítica) que podría inducir la acetilación de p53 a través de la formación de un complejo trimerico p53-PML-CBP (Pearson et al., 2000). Los primeros estudios sugirieron que la acetilación en los residuos de Lys podían activar la unión de p53 a secuencias específicas del DNA in vitro (Gu and Roeder, 1997), estudios posteriores, han demostrado que p53 mutada en varios residuos de Lys en el dominio C-terminal (Lys por Ala) es funcional para unirse al DNA y conserva su actividad transcripcional (Nakamura et al., 2000; Rodriguez et al., 2000). Otros estudios han demostrado que estas mutaciones no impiden que p53 se una a secuencias específicas del DNA pero sí su actividad transcripcional (Espinosa and Emerson, 2001). La acetilación a su vez tiene un segundo papel y es regular la estabilidad de p53. MDM2 se une al dominio N-terminal, pero es en el dominio C-terminal (aa 362-392) donde realiza la ubiquitilación para la degradación de p53 (Kubbutat et al., 1997) (fig 1.15). Estudios más recientes han demostrado que mutación de 4 o 6 residuos de Lys en el extremo C-terminal impide la ubiquitilación de p53 por MDM2, pero no la unión de MDM2-p53 (Nakamura et al., 2000; Rodriguez et al., 2000). En resumen, la acetilación de p53 en los residuos de Lys después del daño al DNA, permite la estabilización de la proteína p53.

1.3.3 Funciones de p53.

El gen supresor de tumores Tp53 es conocido como el “guardián del genoma” porque es activado en respuesta a diferentes formas de estrés celular y cuya finalidad es la inhibición del crecimiento celular (Vogelstein et al., 2000). p53 puede provocar diferentes respuestas, tales como parada del ciclo celular, senescencia, diferenciación y apoptosis; la opción de escoger una u otra depende de muchos factores que pueden ser extrínsecos o intrínsecos a la célula. p53 también permite la reparación del daño genotóxico, sin embargo en ocasiones la inducción de p53 desencadena una inhibición irreversible del crecimiento celular y acaba activando la apoptosis.

p53, como factor de transcripción, regula un centenar de genes y la mayor parte de ellos son inducidos por p53 (Zhao et al., 2000). Los análisis informáticos han identificado miles de secuencias diana para p53 en el genoma humano (Hoh et al., 2002; Wang et al., 2001). Sin embargo, la secuencia consenso no es estricta y puede estar influenciada por otros factores, lo que determina que no se conozca el número exacto de genes diana de p53. La proteína p53 también reprime genes mediante un mecanismo poco conocido donde participan proteínas como TBP (TATA box binding protein) (Ragimov et al., 1993; Seto et al., 1992; Truant et al., 1993) y HDACs (Murphy et al., 1999).

1.3.3.1. p53 y el ciclo celular

p53 puede detener el ciclo celular en las fases G1 y G2. En respuesta a daño al DNA, p53 induce a la que es probablemente más importante de sus dianas transcripcionales, $p21^{Waf1/Cip1}$, un potente inhibidor de complejos quinasas dependientes de ciclinas (fig 1.16) (ver apartado.1.2.2.1).

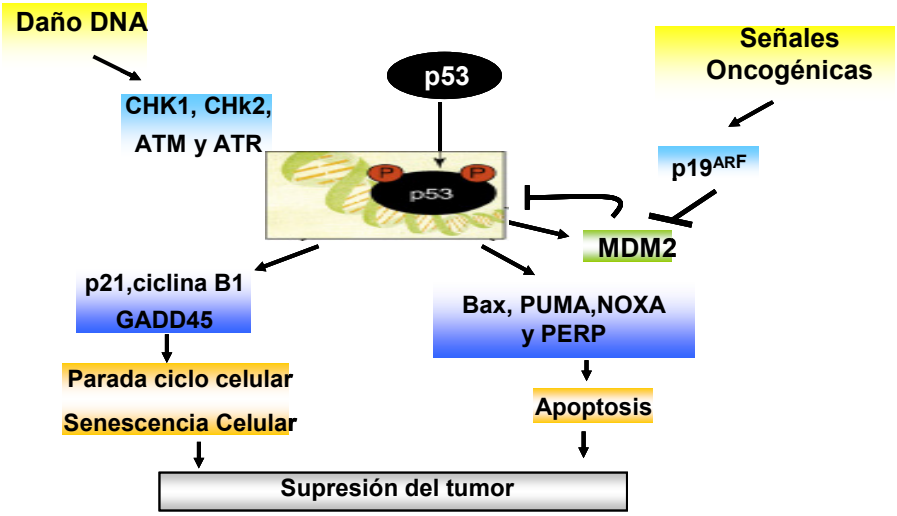


Fig 1.16 Vías dependientes de p53 que median la parada del ciclo celular y la apoptosis. p53 puede modular la transcripción de genes que participan en el control del ciclo celular y en apoptosis. La transcripción de p53 también puede estar regulada por señalización oncogénica vía p19ARF, estableciéndose de este modo una autoregulación (modificada de Fuster J.J., et al 2007).

p53 también puede inducir la parada en G2 mediado por la proteína 14-3-3σ, que secuestra e inhibe la fosfatasa mitótica Cdc25C. Los efectos anti-proliferativos de p53 pueden ser mediados por la inducción de BTG2 (BTG family, member 2) (Rouault et al., 1996) que reprime la transición G1/S y por la represión de Cdk2 (Zhao et al., 2000). p53 también forma parte del "checkpoint" del huso mitótico en mitosis y de esta manera se detiene el ciclo celular cuando las cromátidas hermanas no se han separado adecuadamente (Cross et al., 1995).

1.3.3.2 p53 y apoptosis

La capacidad de p53 para inducir apoptosis es la función más importante de p53 como supresor de tumores (Latonen and Laiho, 2005). p53 induce varios genes que contribuyen a la activación de diferentes rutas apoptóticas, tanto en la vía extrínseca mediada por receptores de muerte celular (Fas/Apo 1, Killer/DR5 y PERP), como en la vía intrínseca centrada en la mitocondria (Apaf-1, Bax, NOXA, p53 IAP1 y PUMA) (revisado en Fridman and Lowe, 2003; Fuster et al., 2007; Latonen and Laiho, 2005; Vousden and Lu, 2002). De estos genes diana de p53, PUMA y NOXA parecen ser absolutamente necesarios para la apoptosis mediada por p53 (Cuadrado et al., 2007; Jeffers et al., 2003; Shibue et al., 2006; Shibue et al., 2003; Villunger et al., 2003). p53 también promueve la apoptosis por la activación de genes que inhiben la supervivencia celular (IGF-BP3, Bcl2, PTEN y Survivina) (Benchimol, 2001; Esteve et al., 2005; Esteve et al., 2007; Hoffman et al., 2002). La capacidad transactivadora de p53 sobre Bid facilita la comunicación entre las vías extrínseca e intrínseca de apoptosis (Sax et al., 2002).

Las funciones apoptóticas de p53 pueden ser dependientes o independientes de su función transcripcional. Se han identificado varios mecanismos sinérgicos, que conectan la proteína p53 con el mecanismo intrínseco de apoptosis por una interacción directa con los miembros antiapoptóticos y proapotóticos de la familia BCL2, que regulan la permeabilidad mitocondrial. Se ha descrito la translocación de p53 a la membrana mitocondrial externa durante los primeros estadios de la apoptosis dependiente de p53 (Marchenko et al., 2000; Sansome et al., 2001). Esta es una respuesta universal que ocurre tanto en células primarias, transformadas, inmortalizadas como en tejidos normales que sufren situaciones de estrés, hipoxia y en des-regularización con oncogenes (Marchenko et al., 2000; Moll et al., 2006; Sansome et al., 2001).

Recientemente se ha demostrado que la mono-ubiquitilación de p53 dependiente de MDM2 promueve la translocación mitocondrial y la apoptosis (Marchenko et al., 2007) (fig 1.17). Diversos grupos confirmaron la existencia de mecanismos mitoncondriales de muerte celular regulados por p53 (Arima et al., 2005; Leu et al., 2004; Yamaguchi et al., 2004; Zhao et al., 2005). En un primer mecanismo se demostró que, una vez en la mitocondria, p53 se une a las proteínas antiapoptóticas, Bcl-XL y Bcl-2, residentes en la membrana mitocondrial (Mihara et al., 2003). Está interacción antagoniza la actividad de proteínas antiapoptóticas y permite la liberación de proteínas proapoptóticas como tBID, BAX o BAK (fig 1.17.a). Un segundo mecanismo describe la activación de miembros pro-apoptóticos tras la interacción de p53 con la proteína proapoptótica BAK (Leu et al., 2004), se produce una competición entre BAK y p53 por la unión a MCL-1 (myeloid cell leukemia factor 1), interrumpiendo así el complejo antiapoptótico BAK-MCL-1, y con ello se produce la liberación de BAK y la activación de la apoptosis (fig 1.17.b).

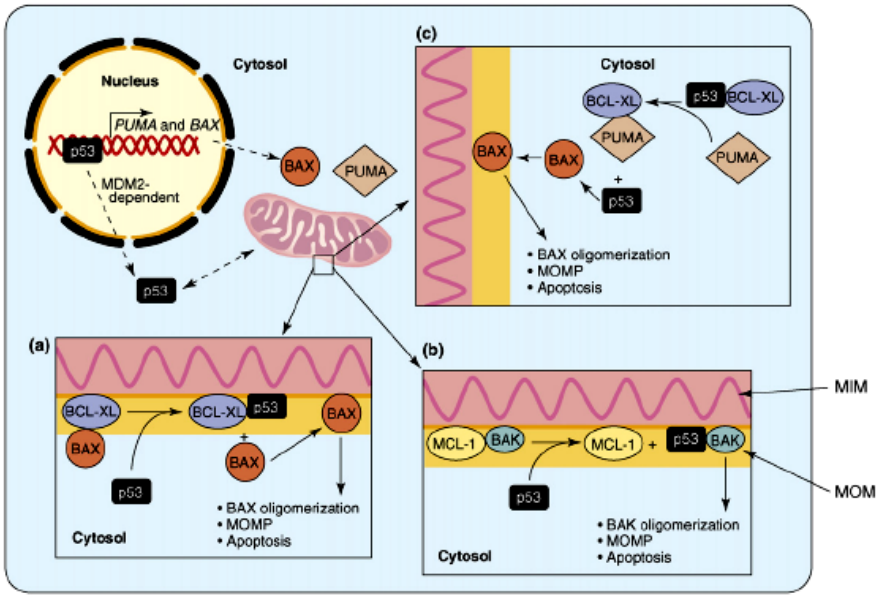


Fig 1.17. Actividades proapóptoticas mitocondriales y citosólicas independientes de la transcripción de p53. a) P53 puede translocarse a la membrana mitocondrial externa y permitir la liberación de factores pro-apoptoticos como tBID y BAX. b) p53 en la mitocondria puede liberar a BAK del complejo inhibitorio BAK-MCL-1. c) El gen diana de p53, PUMA, puede liberar a p53 del complejo inhibitorio p53-BCL-XL. El citosol se muestra en color azul, la membrana mitocondrial interna (MIM) en rosa, la membrana mitocondrial externa (MOM) en amarillo. MOMP, permeabilización de la MOM (Fuster J.J, et al 2007).

En un tercer mecanismo se sugiere que PUMA, un gen diana de p53 que se induce tras el daño celular, se una a los complejos p53-BCL-XL (Chipuk et al., 2005) y permita la liberación de p53 que, una vez en el citosol, promueve la translocación mitocondrial de BAX (fig 1.17.c) y con ello la liberación del citocromo C, dando como resultado la activación de la apoptosis (Chipuk et al., 2004). De esta manera se acoplan las funciones citoplasmáticas y nucleares de p53 (Chipuk et al., 2005).

p53 también contribuye a regular la expresión de receptores de muerte celular en la superficie celular y activar la caspasa 8 (Ding et al., 2000). Otro de los mecanismos controlados por p53, es la regulación que realiza p53 sobre el metabolismo REDOX, y que induce un aumento de moléculas ROS (reactive oxygen species) que contribuyen a la muerte celular por apoptosis (Hwang et al., 2001; Polyak et al., 1997).

1.3.4 p53 y carcinogénesis

Con el fin de estudiar el papel de p53 en ciclo celular se generaron los correspondientes “knock-out” en modelos murinos. Los ratones $p53^{-/-}$ demostraron el papel de p53 como supresor de tumores ya que estos animales desarrollaban tumores malignos entre los 4-6 meses después de su nacimiento, principalmente linfomas de células T (75 %) y fibrosarcomas, con frecuentes aneuploidías y pocas metástasis (Donehower et al., 1992; Jacks et al., 1994; Purdie et al., 1994). Estos ratones son viables y con un desarrollo normal, la única excepción es alta frecuencia en el desarrollo de encefalopatías en los fetos de las hembras. El heterocigoto $p53^{+/-}$ es también más susceptible al desarrollo de tumores espontáneos, aunque con una mayor latencia, y desarrollan un espectro más amplio de tumores comparado con los ratones homocigotos $p53^{-/-}$. Aproximadamente el 50 % de los tumores en ratones $p53^{+/-}$ pierden la heterocigosidad del locus p53 (Donehower et al., 1992; Harvey et al., 1993; Jacks et al., 1994; Purdie et al., 1994) sugiriendo que la completa pérdida de expresión de p53 es importante para el desarrollo de tumores, pero no estrictamente necesario (Venkatachalam et al., 1998).

Por otra parte, existen modelos murinos con un incremento en el número de copias y de actividad de p53. Algunos de estos modelos sugieren que se produce una reducción de la susceptibilidad al cáncer, pero a su vez también existe una correlación lineal entre la ganancia de la actividad oncosupresora y el envejecimiento (Tyner et al., 2002). En contraste con estos resultados, el grupo del Dr. M. Serrano desarrolló un ratón

transgénico “super-p53” que presenta uno o dos transgenes p53 silvestres, además de sus dos alelos endógenos p53. Estos ratones presentan un fenotipo normal respecto al envejecimiento, lo que explica por qué el p53 transgénico está regulado de manera fisiológica y permanece latente en ausencia de estrés celular. Tan sólo se activa en respuesta a daño a DNA y son resistentes al desarrollo de tumores (Garcia-Cao et al., 2002).

Finalmente, la importancia de MDM2 en la regulación de p53 en el desarrollo, se determino en ratones “knock-out” de MDM2 que morían antes de la implantación en el útero (Jones et al., 1995; Montes de Oca Luna et al., 1995) y el fenotipo se recuperaba tras la interrupción del gen p53. A su vez modelos murinos con mutaciones en MDM2, presentan una actividad de p53 como supresora de tumores y sin aumento del envejecimiento (Mendrysa et al., 2006; Mendrysa and Perry, 2006).

1.4 Modelos celulares utilizados en esta Tesis

1.4.1 Modelo celular HCT116

La línea celular HCT116 deriva del carcinoma colorectal (CCR) humano (Brattain et al., 1981; Brattain et al., 1977). Esta línea ha servido de modelo celular para múltiples estudios de proliferación, apoptosis, diferenciación y también para elucidar múltiples mecanismos moleculares y caracterización génica. La línea HCT116 presenta una serie de características que la hacen idónea para estos estudios:

-Contiene el gen p53 silvestre y responde a los agentes que producen daño al DNA. Es por ello un modelo ideal para estudios de ciclo celular y apoptosis (Bunz et al., 1998; Waldman et al., 1995; Waldman et al., 1996).

-Es una línea celular deficiente en MMR (“Mismatch repair”) (Parsons et al., 1993), lo que ha permitido deleccionar varios genes mediante recombinación homóloga para su estudio (Bunz et al., 1998; Chan et al., 1999; Waldman et al., 1995; Zhang et al., 2000).

-Son células susceptibles de ser transformadas por el factor de crecimiento TGF-β1 y TGF-β2 afectando al estado de quiescencia celular o a la progresión por el ciclo celular (Sun et al., 1994).

- Presentan una mutación alternativa de “corte y empalme” que afecta al gen APC (Santoro and Groden, 1997).

-Tiene una mutación en el codón 13 del proto-oncogen K-ras (Schroy et al., 1995).

Las líneas isogénicas creadas con deficiencia de p21 (Waldman et al., 1995) y de p53 (Bunz et al., 1998) nos han servido en nuestro trabajo para determinar el papel de p21 y p53 en apoptosis.

1.4.2 Modelo celular K562

La línea celular K562 deriva de una leucemia mieloide crónica en fase blástica (Lozzio and Lozzio, 1977; Lozzio and Lozzio, 1975). Esta línea celular ha sido ampliamente utilizada como modelo de estudio de neoplasias hematopoyéticas y diferenciación (Bartha et al., 1987; Olah et al., 1996). La línea K562 tiene una serie de características que la hacen adecuada para el estudio de proliferación, diferenciación y apoptosis:

-Expresa la proteína tirosina quinasa Bcr-Abl producto de la translocación t(9;22) que da como resultado la aparición del cromosoma Philadelphia típico de leucemia mieloide crónica (Collins et al., 1987). Bcr-Abl es diana terapéutica de imatinib (Gambacorti-Passerini et al., 1997).

-Es relativamente resistente a la apoptosis por distintos genes y estímulos (Martin et al., 1990; McGahon et al., 1994; Ritke et al., 1994) e incluso a la expresión exógena de p53, comparada con otras líneas hematopoyéticas (Acosta et al., 2003).

-Es una línea celular que tiene los alelos p53 mutados y por lo tanto no expresa p53 y los niveles de expresión de p21 son bajos e independientes de la via p53 (Law et al., 1993).

-Los loci de los genes p15, p16 Y ARF (INK4a e INK4b) están deleccionados (Delgado et al., 2000; Gursky et al., 2001; Ogawa et al., 1994; Quesnel et al., 1996).

-No presenta genes RAS con mutaciones oncogénicas (Janssen et al., 1987).

-Presenta alta expresión del factor de transcripción c-Myc, aunque el gen Myc no esta amplificado (Gomez-Casares et al., 1993), y Myc antagoniza los efectos de apoptosis vía p53 (Ceballos et al., 2000; Ceballos et al., 2005).

-Expresa marcadores eritroides, lo que en un principio hizo que fuese clasificada como “eritroleucemia” (Villeval et al., 1983). Sin embargo es una línea que tiene capacidad de diferenciación pluripotente. Puede ser inducida in vitro hacia linaje eritroide con el tratamiento con 1-β-D- arabinofuranosilcitosina (ARAC), hidroxiurea o hemina, hacia linaje monocito-macrófago por tratamiento con ésteres de forbol (12-0-

tetradecanoliforbol-13-acetato,TPA) o hacia linaje megacariocítico por tratamiento con estaurosporina, STA) (Delgado et al., 1992; Lerga et al., 1999; Shen et al., 1992).

-Es susceptible de citostasis sin diferenciación celular por tratamiento con α-Interferón (IFN) (Gomez-Casares et al., 1993).

A pesar de ser una línea celular transformada, bajo la inducción con distintos agentes deja de proliferar y regula la expresión de genes específicos de células maduras.

Al ser una línea deficiente en genes de la familia INK4 y en p53, es un modelo idóneo para discriminar el efecto específico e individualizado de las proteínas Cip/Kip sobre la proliferación, diferenciación (Munoz-Alonso et al., 2005) y en el caso de p21 sobre la apoptosis, sin tener en cuenta el efecto de otras CKIs.

1.5. Cáncer colorectal (CCR)

El cáncer colorectal es el tercer cáncer en cuanto a letalidad e incidencia en el mundo occidental, tanto en hombres como mujeres. Las distintas etapas en la progresión del cáncer colorectal son las siguientes: epitelio normal → displasia → adenoma temprano → adenoma tardío → carcinoma → metástasis.

Está descrito en muchos tumores humanos, que son necesarias múltiples alteraciones para el desarrollo de un tumor maligno. En CCR se han observado alteraciones genéticas a nivel de proto-oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores del DNA (tabla 1.1). Está descrito, que se necesitan al menos siete de estas alteraciones para que se desarrolle un tumor maligno (Kinzler and Vogelstein, 1996).

Se pueden distinguir tres tipos diferentes de CCR: 1) la poliposis adenomatosa familiar o FAP (Familial Adenomatous Polyposis), afecta tan solo al 0,01% de la población general; 2) el cáncer hereditario no poliposo, denominado HNPCC (Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer), representa el 5-10% de todos los CCR, y 3) el tipo esporádico o común representa el 90 % de todos los CCR. Precisamente, ha sido gracias a los estudios de genética molecular realizados en los dos primeros, como ha podido establecerse un modelo genético que es extensivo para los casos esporádicos. Todo ello, ha podido poner de manifiesto que las alteraciones genéticas son amplias y numerosas, afectando a genes con misiones muy diferentes en proliferación y división celular. Algunos de los genes donde se observa alteraciones son: 1) oncogenes como RAS (K-Ras), MYC, HER-2/NEU Ciclinas; 2) genes supresores de tumores como son DCC (deleted in colorectal cancer), APC, p53, Nm23H1/2, p27 y TGF-βRII; 3) genes

reparadores del DNA como son MSH2, MLH1, PMS1 y PMS2, (revisado en Kinzler and Vogelstein, 1996) (tabla1.1)

Tabla 1.1 Genes implicados en carcinogénesis colorectal.

Gen	Presencia	Función	Comentarios
K-ras	30-40 %	Transducción de señales	Mutaciones puntuales
Ciclinas	4 %	Regulación ciclo celular	Sobre-expresión
Neu/her 2	4 %	Receptor factor de crecimiento celular	Amplificación
Myc	60 %	Factor de transcripción	Sobre-expresión
Nm23H1	-	Inhibe Metastasis	Sobre-expresión
Nm23H2	-	Inhibe Metastasis	Sobre-expresión
APC	60 %	Adhesión Celular	Pérdida de heterocigosidad Mutaciones
DCC	70 %	Adhesión Celular	Pérdida de heterocigosidad
p53	70 %	Parada ciclo celular G1	Mutación Germinal
p27	-	Regulador ciclo celular	Pérdida de expresión
Bax	50 en MMP+	Inductor de apoptosis	Mutaciones
TGF-RII	15 en MMP+	Transducción de señales	Mutaciones
hMLSH2	60 %	Reparación del DNA	Mutación Germinal HNPCC
hMLSH1	30 %	Reparación del DNA	Mutación Germinal HNPCC
hPMS1	0-5 %	Gen susceptibilidad	Mutación Germinal HNPCC
hPMS2	0-5 %	Gen susceptibilidad	Mutación Germinal HNPCC

En la literatura médica se describe el cáncer colorectal con las etapas o estadios siguientes:

- Etapa 0: El cáncer se encuentra solo en el revestimiento más interno del colon o recto. *Carcinoma in situ* es otro nombre para cáncer en etapa 0.
- Etapa I: El cáncer ha crecido dentro de la pared interior del colon o recto. El tumor no ha llegado a la pared exterior del colon o no se ha extendido fuera del colon. Etapa A de Duke es otro nombre para la Etapa I de cáncer colorectal.
- Etapa II: El tumor se extiende con más profundidad dentro de la pared del colon o del recto o a través de ella. Es posible que haya invadido tejido cercano, pero las células cancerosas no se han diseminado a los ganglios linfáticos. Etapa B de Duke es otro nombre para la Etapa II de cáncer colorectal.

- Etapa III: El cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos cercanos, pero no a otras paredes del cuerpo. Etapa C de Duke es otro nombre para la etapa III de cáncer colorectal.
- Etapa IV: El cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo, como el hígado o pulmones. Etapa D de Duke es otro nombre para la etapa IV de cáncer colorectal.

1.6 Fármacos utilizados en esta Tesis

1.6.1 Imatinib

Imatinib (gleevec, glivec o STI571) es un de inhibidor de tirosina-quinasas. Fue el primer antitumoral usado en clínica contra la oncoproteína Bcr-Abl. Esta es producto de una translocación cromosómica (t(9;22) y es una proteína de fusión entre Bcr y la tirosina-quinasa Abl. La principal propiedad transformante de esta proteína reside en su actividad constitutiva tirosina quinasa. Druker y colaboradores, demostraron que imatinib suprime selectivamente el crecimiento de líneas celulares de LMC y colonias de unidades granulocito-macrofago (CFU-GM) obtenidas de pacientes con LMC (Druker et al., 1996).

Imatinib se incluyó en ensayos clínicos en 1998 y los resultados obtenidos, demostraron una mejora considerable respecto a interferón α (IFN-α). Más del 90% de los pacientes con LMC en fase crónica refractraria a IFN-α obtuvieron respuesta hematológica completa durante el tratamiento con imatinib y cerca de un 40-45% lograron respuestas citogenéticas (Druker, 2001). Estudios pre-clínicos han demostrado que algunas células Bcr-Abl positivas pueden eludir los efectos inhibidores de imatinib por diversos mecanismos. Estos mecanismos incluyen sobre-expresión de Bcr-Abl como una posible consecuencia de la amplificación del gen, sobre-expresión de la glicoproteína P, resultando la reducción en los niveles intracelulares de imatinib, o posiblemente, por la degradación excesiva de la proteína Bcr-Abl. Pero el mecanismo de resistencia más común son mutaciones puntuales que hacen de Bcr-Abl una proteína insensible a la inhibición por imatinib (Mahon et al., 2000).

Imatinib es también un inhibidor tirosina-quinasa del receptor c-Kit, cuyo ligando es el Stem Cell Factor (SCF) y, en menor medida, del receptor tirosina-quinasa PDGF (factor de crecimiento asociado a plaquetas), bloqueando los efectos de PDGF en síndromes mieloproliferativos crónicos (Capdeville et al., 2002)). Estos dos receptores presentan una gran similaridad en el dominio quinasa. El receptor c-Kit está activado en

algunos tumores, incluyendo CCR (Attoub et al., 2002; Bellone et al., 2001), y en casi todos los tumores de estroma gastrointestinal, así como en diversos tipos de leucemia (Spiekermann et al., 2003).

Son muchos los estudios clínicos realizados con imatinib y actualmente se sabe que imatinib inhibe otras proteínas quinasas a dosis mayores. Algunas de estas otras quinasa son c-Raf-1, FGF-R1, IGF-IR, VEGF-R, p38, AKT, PDK1 y Cdk1 (Deininger, 2005)).

El imatinib ocupa el lugar de unión del ATP en la quinasa y este impedimento estérico bloquea la fosforilación del sustrato (fig 1.18). Los dominios de activación de las proteínas tirosina-quinasas son muy parecidos entre si. Sin embargo, estos dominios entre quinasas que están inactivas son muy diferentes. Imatinib se une específicamente al dominio de activación de Abl cuando la quinasa está inactiva, lo que explicaría la selectividad de imatinib por Abl y quinasas con dominios de activación parecidos (Deininger, 2005).

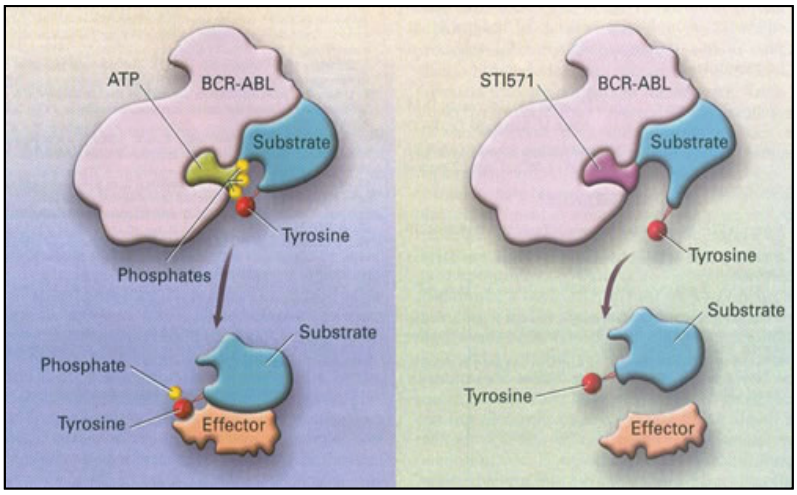


Fig 1.18 Mecanismo de acción de imatinib. Imatinib ocupa el lugar de unión del ATP bloqueando de este modo la fosforilación del sustrato e inhibiendo la actividad tirosin-quinasa desregulada de Bcr-Abl (Goldman JM and Melo JV, 2001).

Otro inhibidor tirosina-quinasa que hemos utilizado en este trabajo de Tesis, para contrastar nuestros resultados, es Gefitinib, inhibidor de EGF-R (Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano). Presenta el mismo mecanismo de acción que imatinib y es usado para el tratamiento de tumores de pulmón no microcíticos (NSCLC) (Frampton and Easthope, 2004).

1.6.2 Adriamicina (ADR)

La adriamicina (ADR) o doxorubucina es un anti-neoplásico de la familia de las antraciclinas. Su emplea en la leucemia aguda linfócitica, en cáncer de mama, pulmón, linfómas, mieloma, neuroblastoma, sarcomas de hueso y tejido blando, timoma y tumor de Wilms. La molécula de ADR posee una estructura tetracíclica con una azúcar poco común, la L-daunosamina, unida por enlaces glucosídicos, y tiene restos de hidroquinona en los anillos adyacentes.

Se han descrito múltiples acciones de las antraciclinas, cuya contribución a las acciones antineoplásicas y citotóxica es variable. El mecanismo de acción de las antraciclinas es todavía muy controvertido y sigue siendo objeto de estudio (Takemura and Fujiwara, 2007). Para la ADR, se conocen varios mecanismos de acción: a) a nivel de la membrana celular, alterando su permeabilidad, b) generando radicales libres y c) como agentes intercalantes en el DNA e inhibidor de enzimas nucleares tales como DNA y RNA polimerasas y topoisomeras (Cullinane and Phillips, 1990; Li and Yu, 1993).(Zeman et al., 1998).

La ADR se intercala en el DNA bicatenario, de manera que inhibe tanto su transcripción como su replicación (fig 1.19). Mediante estudios de transcripción in vitro se sabe que la ADR se une al DNA casi exclusivamente en secuencias GpC involucrando al 2-NH_2 de la guanina (Cullinane and Phillips, 1990).

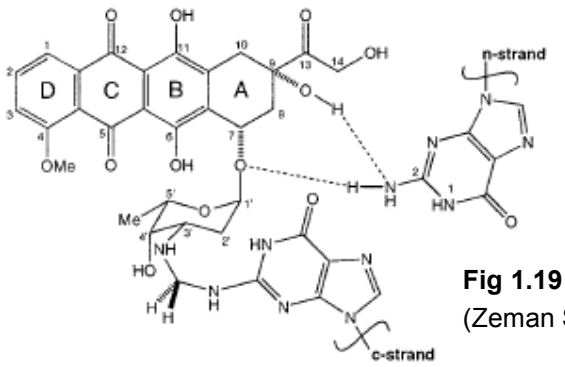


Fig 1.19 Interacción de la ADR con el DNA (Zeman SM et al., 1998).

El tipo de unión que se establece entre ADR y el DNA es de tipo covalente con una de las cadenas, estabilizándose el dúplex mediante interacciones no covalentes con la cadena complementaria.

Esta capacidad de la ADR para intercalarse en el DNA permite que el fármaco se una al complejo binario DNA-topoisomerasa II (Topo II) formando un complejo terciario de

gran estabilidad, que inhibe la capacidad de la religación de la Topo II y genera roturas (Binaschi et al., 1995; Glisson and Ross, 1987; Osheroff, 1989). El mecanismo de acción citotóxico de la ADR también se ha relacionado con la producción de radicales libres de oxígeno, peróxidos de hidrógeno y radicales de semiquinona, que puede interaccionar tanto con proteínas como con el DNA (Turner et al., 1990). Otros efectos citotóxicos de la ADR, son la inhibición de sistemas enzimáticos (Coenzima Q), la peroxidación de lípidos, la liberación de histaminas y catecolaminas y la interferencia con el transporte mitocondrial de electrones (Kohn, 1996).

En esta Tesis la ADR ha sido utilizada como control de nuestros experimentos. Se había descrito que este fármaco inducía la acumulación de p21 vía dependiente de p53 en el modelo celular HCT116 (Ravizza et al., 2004; Waldman et al., 1995). Además, ha sido descrita la mayor sensibilidad de la línea celular HCT116p21$^{-/-}$ a daño genotóxico con ADR o 5-FU respecto a la línea parental (Bunz et al., 1999; Javelaud and Besancon, 2002). Por lo tanto, se concluyó que p21 protegía a las células de fármacos genotóxicos.

En esta Tesis, nos preguntamos si el efecto observado con adriamicina también podría ocurrir con fármacos inhibidores de la actividad tirosina-quinasa, cuyo mecanismo de acción no es inducir directamente daño en el DNA.

.

2.~ OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

p21 es miembro fundador de la familia de inhibidores de ciclo celular Cip/Kip. Sin embargo, hay otras funciones de p21 no están solo relacionadas con ciclo celular. En esta Tesis Doctoral hemos querido ahondar sobre dos de estas funciones: apoptosis y regulación en la expresión génica.

- El papel de p21 en apoptosis está descrito y documentado en respuesta a distintos estímulos y fármacos genotóxicos. Sin embargo, se desconoce el papel de p21 cuando una célula es tratada con inhibidores tirosina-quinasa como imatinib y gefitinib, cuyo mecanismo de acción no implica daño genómico. En este trabajo de Tesis, hemos profundizado en la relación de p21 e inhibidores tirosina-quinasa.

- El papel de p21 como co-factor transcripcional es relativamente reciente y muy discutido. Dada la importancia que tiene, en esta Tesis hemos querido indagar está función de p21 en nuevos modelos.

Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Estudiar el efecto de p21 en respuesta a inhibidores tirosina-quinasa sobre la proliferación y la apoptosis en el modelo celular de cáncer colorectal, mediante la expresión ectópica y el silenciamiento de p21.
2. Estudio del efecto de p21 sobre la expresión y actividad de p53 en el modelo celular de cáncer colorectal.
3. Estudiar el papel de p21 en la apoptosis provocada por imatinib en células de leucemia mieloide crónica, mediante una línea derivada con expresión ectópica condicional de p21.
4. Estudiar las modificaciones que ejerce p21 sobre la expresión génica, que ayude a esclarecer el papel de p21 como co-factor transcripcional.
5. Estudiar la expresión de p21 en muestras clínicas de cáncer colorectal.

3.~ MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Análisis del DNA y RNA.

3.1.1.Obtención del DNA plasmídico, digestión con endonucleasas de restricción y electroforesis en geles de agarosa.

Los cultivos bacterianos se crecieron en 500 mL de Luria Broth (LB) durante 12 horas a 37º C. El cultivo se centrifugó a 6000 rpm durante 20 min y el sedimento de células se resuspendió en 10 mL de tampón de lisis (200 mM NaOH y 1% SDS), se mezcló por inversión 6-8 veces y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron 10 mL de una solución 3M de acetato potásico pH 5,5, y se incubó 5 min en hielo. Se centrifugó la mezcla durante 20 min a 10.000 rpm y a 4º C. Para la obtención del DNA plasmídico, el sobrenadante se pasó por columnas de intercambio de Qiagen siguiendo las instrucciones del fabricante. Al eluído obtenido se le añadieron 10 mL de isopropanol y se dejó precipitar el DNA durante 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó la mezcla a 10.000 rpm durante 30 min y a 4º C de temperatura. El precipitado de DNA se lavó con 1 mL de etanol al 75 %, se secó y se disolvió en 300 µL de agua destilada estéril.

Las digestiones de los plásmidos se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del suministrador de enzimas (Roche, Amersham, Fermentas, Invitrogen). Los fragmentos de restricción se separaron por electroforesis en geles de agarosa (Pronadisa) con 0,5 µg/mL de bromuro de etidio en tampón TAE (0,09 M Tris-acetato, 2 mM EDTA). Se añadió tampón de carga (0.005 % (w/v) de azul de bromofenol 2 % y 30 % (v:v) glicerol 100 %) a las muestras, se cargaron y se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa durante 1 h a 100 V. Como marcadores de peso molecular se utilizaron los preparados de “1 Kb DNA ladder” o “100 bp DNA ladder” (Fermentas).

3.1.2 Marcaje radiactivo de sondas.

Para marcaje del DNA se utilizó el método del primado azar (“Kit Ready to Go “, Amersham) según las indicaciones recomendadas por el fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo en volumen final de 50 µL contenido: 25-50 ng de DNA, previamente desnaturalizado a 100º C durante 2 minutos, una mezcla de dATP, dTTP, dGTP, una

mezcla de oligodesoxinucleótidos de secuencia variable y de 4-8 unidades del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de E.Coli. Se añadieron 50 µCi de α^{32}P-dCTP (Amersham, 3000 Ci/mmol). La mezcla se incubó a 37º C durante 30-45 min. Para separar los nucleótidos marcados no incorporados, se utilizó una columna de sephadex "ProbeQuant TM G-50 Columm Samples "(Amersham).

3.1.3 Plásmidos utilizados.

El cDNA humano completo que codifica para p21 fue obtenido mediante la digestión con Not1 del vector pBSK-p21 (M. Serrano CNIO, Madrid) y subclonado en la orientación con sentido en el vector de expresión eucariótico pMT-CB6+ (F.J. Rausher, Wishar Inst. Philadelphia) que contiene el gen de resistencia a neomicina y el promotor de la metalotioneía para la expresión inducible mediante la adición de 75 µM $ZnSO_4$ al medio de cultivo.

Los plásmidos utilizados como vectores de expresión y para la obtención de sondas se describen en las tablas 3.1 y 3.2, respectivamente.

Tabla 3.1. Plásmidos utilizados como vectores de expresión (v) indica vectores vacíos

PLÁSMIDO	PROCEDENCIA	REFERENCIA
pBpuro c-Myc-ER	T. Littewood	Littlewood et al 1995
pBabe-puro (v)	T. Littewood	Littlewood et al 1995
pMT-CB6+ (v)	F.J. Rausher	Andrews et al 2000
pMT-CB6-p21	Este Laboratorio	Munoz-Alonso et al 2005
pGL2M4-Luc	R. Eisenman	Hurlin et al 1997
pGL2 (v)	Comercial	Promega
pGL3-Basic (v)	Comercial	Promega
pG13PY-Luc	B.Volgestein	Kern et al 1992
pLPCX (v)	M.Serrano	
pCEFL (v)	P.Crespo	

PLÁSMIDO	PROCEDENCIA	REFERENCIA
pCEFL-Myc	I. Mauleon	Vaque et al 2005
pGL3-Mdm2-Luc	M. Oren	Ceballos et al 2005
PR-Null	Comercial	Promega
pGL3-Waf1-Luc	M.Oren	El-Deiry et al 1993
pcDNA3-hKIT	P. Dubreuil	
pcDNA3-DDp53	C.Marin	Bowman et al 1996
pcDNA3 (v)	Comercial	Promega
pSR-shp53	C.Marin	Brummelkamp et al 2002
pSR (v)	Comercial	Oligoengine
pRS-shp21	M.Eilers	Esta Tesis
pRS (v)	Comercial	Oligoengine
pEGFP-C1 (v)	Comercial	Clontech
pEGFP-p21WT	N.Agell	Rodriguez-Vilarrupla et al 2002
pEGFP-p21CTWT	N.Agell	
pEGFP-p21NT	N.Agell	
pDsRed (v)	Comercial	Clontech
pDsRed-p21NLSA	N.Agell	Rodriguez-Vilarrupla et al 2002

Tabla 3.2. Plásmidos utilizados para la obtención de sondas de hibridación

SONDAS	PLÁSMIDO	FRAGMENTO	TAMAÑO (KB)	PROCEDENCIA	REFERENCIA
MYC (humano; exón 3º en pBluesScript)	PSK-Myc	EcoRI/ClaI	1,5	R. Dalla-Favera	Dalla-Favera et al 1983
p21 (humano; promotor p21)	PGL3-Waf 1-Luc	Hind III	2,3	M. Oren	El-Deiry et al 1993
p21 (humano)	pCEFL-p21	Not I	0,6	M. Serrano	Delgado et al 2000
18S (humano)	PBS-18S	EcoRI	1,5	Comercial	ATCC

3.1.4 Preparación del DNA genómico e hibridación de Southern blot.

La técnica de southern blot la realizamos para corroborar las mutaciones del gen p21 en el modelo celular HCT116p21$^{-/-}$ tal y como había sido publicado (Waldman et al., 1995) (fig 3.1).

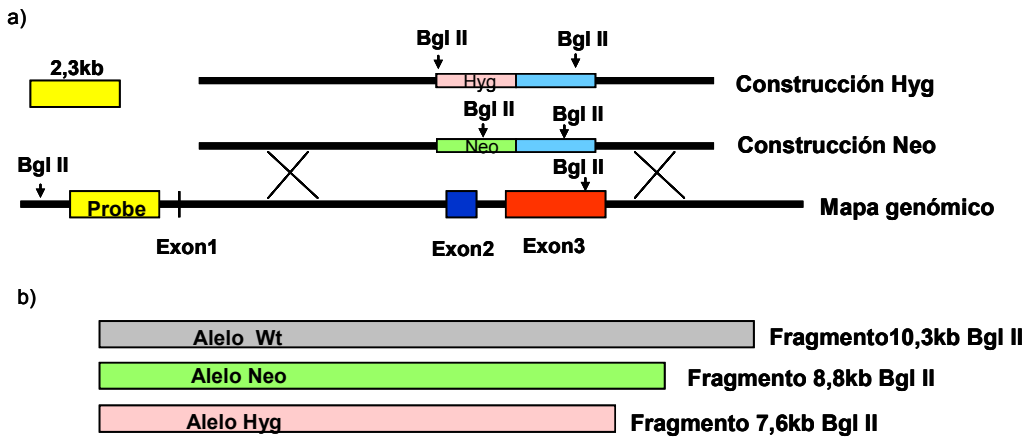


Fig 3.1 Mutación del gen p21 por recombinación homologa en la línea celular HCT116p21$^{-/-}$. a) Mapa de las regiones genómicas del gen p21, junto con un diagrama de los constructos utilizados para deleccionar el gen. b) Tamaño de los fragmentos obtenidos con la enzima de restricción Bgl II en el alelo WT y en los alelos neomicina (Neo) y higromocina (Hyg) (Waldman T et al., 1995).

Para la extracción de DNA genómico se utilizó el método de extracción con DNAzol (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA genómico obtenido se resuspendió en 300 µL TE (1 M Tris pH 8,0, 0,5M EDTA pH 8,0).

Los DNAs extraídos se cuantificaron y alrededor de 15 µg fueron digeridos con la enzima de restricción apropiada (Bgl II) y utilizando una alta concentración de enzima. La digestión se realizó durante 24 h a 37º C. Los fragmentos de restricción se separaron por electroforesis en geles de agarosa como ha sido descrito en el apartado 3.1.1, utilizando geles de 0,8 % y tampón TBE (1M Tris-Borato, 0,5 M Na_2 EDTA pH 8,0). Posteriormente se desnaturalizó el gel de DNA mediante una solución 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl durante dos lavados de 15 min. Tras lavar con agua durante 1 min se neutralizó el gel con una solución 0,5M Tris pH 7,4, 1,5 M NaCl en dos lavados de 30 min en un agitador. Finalmente se equilibró el gel de DNA con 10 X SSC (3 M NaCl, 0,3 M citrato sódico) durante 10 minutos.

La transferencia del DNA a membranas de nitrocelulosa (Millipore) se llevó a cabo siguiendo el método de Sourthern blot (Sambrook et al 2001). El DNA se transfiere a la

membrana por capilaridad, utilizando como eluyente la solución 10xSSC (3 M NaCl y 0,3 M citrato sódico) por 16 h. Después de la transferencia, el DNA se fijó al filtro por exposición a la luz ultravioleta (Stratalinker, Stratagene).

Los filtros se prehibridaron a 42º C en tubos de vidrio durante 1-2 h, con una solución al 40 % de formamida desionizada, 5xDenhardt´s (Sambrook et al 2001), 50mM fosfato sódico pH 7, 0,1 % SDS, 5 mM EDTA pH 8,0, 75 mM NaCl y 150 µg/mL DNA de esperma de arenque sonicado y desnaturalizado por ebullición durante 5 min. La hibridación se prolongó durante 24 h a 42º C y con rotación. Finalizada la hibridación, las membranas se lavaron con una solución 0,2 % SDS-1xSSC, durante 30 min a 65º C. Las membranas se autorradiográfiaron en películas Kónica-Minolta, con pantallas amplificadoras (Dupont Lightning Plus) a -70º C. Para la cuantificación de la radiactividad se utilizó el Molecular Imager de BioRad.

3.1.5 Preparación del RNA total e hibridación por Northern blot.

Para la extracción del RNA celular se utilizó el método de extracción con Trizol (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para evitar la degradación del RNA todas las soluciones fueron tratadas con 0,1 % dietilpirocarbonato (DEP) (Calbiochem) y autoclavadas.

Los RNA se sometieron a electroforesis en geles desnaturalizantes de agarosa-formaldehído, para fraccionarlos en función de su tamaño molecular. Los geles se prepararon según la formula siguiente: 1% (w/v) de agarosa en tampón MOPSx1 (20 mM MOPS sódico, 5 mM acetato sódico y 1 mM EDTA pH 7,0), y formaldehído 2,2 M. Las muestras de RNA (15-30 µg) se mezclaron con 2 volúmenes de tampón de muestra (MOPSx1, 50 % formamida, 2,2 M de formaldehído, 6 % glicerol, 10 % (w/v) azul de bromofenol y 0,5 µg/µl de bromuro de etidio por muestra. La mezcla se calentó a 65º C durante 10 min y se mantuvo en hielo, hasta ser cargada en el gel. La electroforesis se llevó a cabo en tampón MOPSx1 durante 15 h a 15 mA, o durante 4 h a 40 mA.

La transferencia del RNA a membranas de nitrocelulosa (Millipore) se llevó a cabo siguiendo el método de Northern blot (Sambrook et al 2001). El RNA se transfiere a la membrana por capilaridad, utilizando como eluyente la solución 20xSSC (3 M NaCl y 0,3 M citrato sódico) por un periodo no inferior a 6 h. Después de la transferencia, el RNA se fijó al filtro por exposición a la luz ultravioleta (Stratalinker, Stratagene). Estos filtros pueden conservarse en un lugar seco durante meses antes de ser hibridados. Los filtros

se hibridan tal y como se describió en el apartado anterior 3.1.2. La cuantificación se llevó a cabo en el Molecular Imager .

3.1.6 Análisis de la expresión génica por Macroarray.

Para caracterizar la expresión de genes regulados tras el tratamiento con un fármaco, se uso un "GeArray^{TM} Q Series Human Apoptosis Gene Array" (HS-002) (SuperArray Bioscience Corpotation., Frederick, MD). Con este GeArray podemos determinar la expresión de 96 genes involucrados en la regulación y en la mediación de la apoptosis o programa de muerte celular. Cada uno de estos cDNAs aparece como "spots" cuadruplicados.

Los RNAs de las muestras a analizar se extrajeron con Trizol (Invitrogen) y la conversión de RNAs (alrededor de 3 µg) a cDNAs se realizó con la transcriptasa reversa de MMLV (RT-Labeling Kit Invitrogen) y utilizando [α-^{32}P]-dCTP (Amersham), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cDNAs marcados radiactivamente con ^{32}P se hibridaron con las membranas conteniendo los cDNAS de los genes de objeto de estudio. Para ello, se prehibridaron las membranas con una la solución "GEAprehyb" durante 1 ó 2 h a 60º C y se hibridaron luego con los cDNAS marcados radiactivamente en 750 µL de la solución de prehibridación durante 24 h a a 60º C. Finalizada la hibridación, las membranas se lavaron con una solución 1 % SDS-2xSSC, durante 15 min a 60º C.

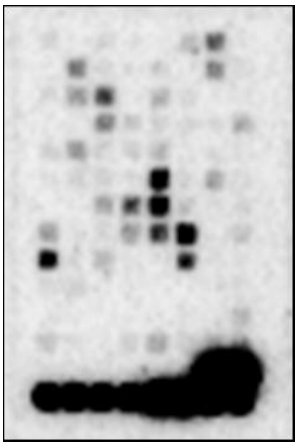


Figura 3.2. Ejemplo de imagen de una membrana HS-002 hibridada con el RNA de células HCT116 p21$^{-/-}$ tratadas con 15 µM Imatinib durante 48 h.

Tras este primer lavado, se realizó otro lavado con 0,5% SDS- 0,1 % SSC, durante 15 min a 60º C. Las membranas se autorradiografiaron en películas Kónica-Minolta, con pantallas amplificadoras (Dupont Lightning Plus) a -70º C. Para la

cuantificación de la radiactividad se utilizó el Molecular Imager de BioRad y las señales se cuantificaron con el programa informático "Quantity One".

Con los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico y los datos se normalizaron de forma relativa respecto a estándares internos, el gen de β-actina y de GAPDH. El programa informático usado fue suministrado por GeArray ("Imagen, Data and Statistical Análisis Software Package for the GeArray from Superaría") siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.1.7. Secuenciación de DNA mediante la transcripción inversa (RT) y PCR.

Para la secuenciación del gen p53 en las líneas HCT116 WT y HCT116 p21$^{-/-}$ se recurrió a la RT-PCR partiendo de RNA total de las células. Para la transcripción inversa, se utilizó 1 µg de RNA total disuelto en una mezcla que contenía 50 mM Tris-HCl pH 8,3, 40 mM $MgCl_2$, 10mM DTT, 10 mM de una mezcla de dNTPs, 2,5 µM de hexámeros al azar, 20 unidades/ µL de inhibidor recombinante de la Rnasa Out™ y 100 unidades de la enzima transcriptasa reversa de MMLV (todo de Invitrogen). Esta reacción se incubó a 42º C 50 min y luego 5 min a 95º C para inactivar a la enzima. Una vez obtenido el cDNA en la reacción RT, se utilizó 1 µL de cDNA, se realizaron las reacciones de PCR con cebadores específicos para poder secuenciar el gen p53 (tabla 3.3). Las reacciones de PCRs se llevaron a cabo en un volumen final a de 50 µL que contenía 0,3 µM de cada oligonucleótido, usando el reactivo Ready Mix RedTaq PCR Reaction (Sigma). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con el siguiente programa: 95º C 5 minutos, (95º C/ 1 min, 55 º C/1 min, 72º C/ 1 min) durante 35 ciclos, y 72º C 7 min. Las PCRs se realizaron en el termociclador Robocycler Gradient 40 de Stratagene. El producto de la PCR se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa y el inserto obtenido se purificó con el kit de extracción de producto de PCR QIAquick (Qiagen) según lasinstrucciones del fabricante.

Tabla 3.3 Primeros empleados para la secuenciación del gen p53

Gen amplificado	Cabadores utilizados	Tamaño del amplicón
p53 (exón 2-10)	5´-TCCCAAGCAATGGATGATTT-3´ 5´-ACACGCAAATTTCCTTCCAC-3´	500 pb
p53 (exón 6-11)	5´-ACATAGTGTGGTGGTGCCCT-3´ 5´-TCAGTCTGAGTCAGGCCCTTCTG-3´	544 pb

3.1.8. Análisis de la expresión génica por Microarray.

Los cRNAS biotinilados se prepararon a partir de las muestras de RNA total, e hibridaron (45º C, 16 horas) al GeneChip Humano HG-U133A de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Affymetrix). Los "arrays" hibridados se lavaron y marcaron mediante el "GeneChip fluidics station 400" y se escanearon "Agilent G2500 GeArray Scanner". Este proceso fue realizado por la Unidad Genómica y Proteómica del Centro de Investigación del Cáncer en Salamanca (CIC). Los GeneChips de Affymetrix están fabricados con una tecnología que combina los métodos fotolitográficos y la química combinatoria. En estos microarrays cada gen o transcrito esta representado por un "grupo de sondas" cada uno de los cuales consiste generalmente en 16-20 pares de sondas. Cada par consta de un oligonucleótido de 25 nucleótidos perfect match (perfectamente complementario a la secuencia de referencia) y un oligonucleótido mismatch (idéntico al anterior pero con un cambio en la posisición 13) que sirve para discriminar entre hibridaciones específicas e inespecíficas. En esta memoria nos referiremos a los grupos de sondas que representan un gen como "sondas".

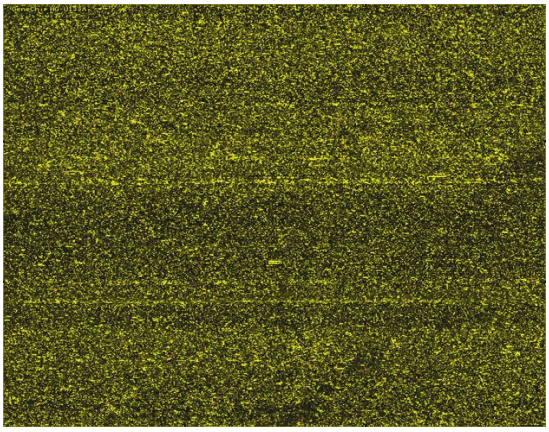


Figura 3.3. Ejemplo de archivo imagen "CEL" del biochip de affymetrix HG-U133A hibridado con RNA de células Kp21 tratadas con $ZnSO_4$ durante 12 h.

Los archivos de imagen de alta resolución obtenidos por el software Affymetrix GCOS tras el escaneado de los biochips HG-U133A (archivos "CEL"), se normalizaron con el software (www.hsph.harvard.edu/biostats/complab/dchip) "dChip" (Li et al 2001) para la intensidad media, usando el criterio PM-MM (Perfect Match-Mismatch) que sustrae los errores del fondo de señal del ajuste de la intensidad de cada par de sondas, y analiza exclusivamente los genes con señal ("present calls"). Los niveles de expresión medidos se transformaron a escala logarítmica (log_2). El análisis de cada condición

experimental se basó en 2 experimentos independientes. Las réplicas se usaron para calcular las medias y desviaciones estándar para los valores de expresión de todas las sondas para cada condición. Cada señal se consideró válida si aparecía en los dos experimentos realizados.

La búsqueda de redes de interacción biológica se realizó con la aplicación "Ingenuity Pathways Analysis" (www.ingenuity.com). Se analizaron tanto las conexiones directas como las indirectas, utilizando como criterio de selección la presencia de un score > 35. Score es una medida significativa de las conexiones encontradas (a mayor valor, menor es la probabilidad de que alguna conexión sea debida al azar)

Los resultados del análisis de microarray se validaron por RT-PCR cuantitativa a tiempo real (ver tabla 3.4).

3.1.9 Transcripción inversa (RT) y PCR cuantitativa.

Para la cuantificación de la expresión de mRNA se recurrió a la RT-PCR cuantitativa a tiempo real, partiendo de RNA total. Para la transcripción inversa, se utilizó 1 µg de RNA total disuelto en una mezcla que contenía 50 mM Tris-HCl pH 8,3, 40 mM $MgCl_2$, 10mM DTT, 10 mM de una mezcla de dNTPs, 2,5 µM de hexámeros al azar, 20 unidades/ µL de inhibidor recombinante de la Rnasa Out™ y 100 unidades de la enzima transcriptasa reversa MMLV (todo de Invitrogen). Esta reacción se incubó a 42º C 50 min y luego 5 min a 95º C para inactivar a la enzima. Una vez obtenido el cDNA en la transcripción inversa, se realizaron las reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos específicos para cada gen (ver tabala 3.4) utilizando la mezcla de reacción de IQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad), que contiene SYBR Green para la detección (fluoróforo que se une al DNA de doble hebra), dNTPs con UTP, tampón de reacción y la iTaq DNA polimerasa. La enzima se activa cuando se somete a elevadas temperaturas de 95º C durante al menos 3 min, evitando de este modo la hibridación inespecífica de los cebadores. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador "iCycler IQ™ Multi-Color Real Time PCR Detection System "(BioRad).

Las condiciones de la PCR fueron: 95ºC/ 15 min, (95ºC/30 s; 56ºC/45 s; 72ºC/45 s) 40 ciclos y 72ºC/ 5 min. La temperatura de fusión (Tm) viene determinada en función del oligonucleótido y es la temperatura en la que se produce el anillamiento de los oligos. Finalmente hubo otro paso de 10 segundos a 65º C que se repite durante 60 ciclos con

aumento de 0,5º C en cada ciclo. En este último paso se obtiene la denominada "curva de desnaturalización". Durante este incremento de temperatura, el DNA se desnaturaliza y el SYBR Green se libera, produciéndose una disminución progresiva de la fluorescencia. Esta fluorescencia va a tener un punto de inflexión que corresponde a la Tm y que es específico de cada DNA, siendo un indicador de la especificidad de producto.

La cuantificación se realizó de forma relativa respecto a un estándar interno (house-keeping), el gen de la proteína ribosomal S14 (RPS14), y basándonos en la detección de la fluorescencia a tiempo real que nos permite correlacionar el valor del ciclo umbral (CT o ciclo en el que la fluorescencia empieza a crecer significativamente).

Variación relativa $=2 - \Delta(\Delta C_T)$

Donde $\Delta C_T = C_{Tgen} - C_{TRPS14}$

Y $\Delta(\Delta C_T) = \Delta C_T - \Delta C_{\text{Control negativo(mezcla sin RNA)}}$

El valor resultante de aplicar esta fórmula se normalizó con el valor obtenido de aplicar la mima formula a las muestras control para determinar, de este modo, obtenemos el aumento o la disminución en la expresión de un gen con respecto a su control.

Tabla 3.4. Cebadores usados para los ensayos de RT-PCR a tiempo real. Todos corresponden a genes humanos excepto pEGFC1.

Gen amplificado	Cabadores utilizados	Tamaño del amplicón
ORC1L	5´-CCAGCTGGTAGCCAGGAAAG-3´ 5´-CCATTGAGTGGGATATGGTG-3´	143 pb
Histona H4	5´-ATGTCTGGGCGAGGTAAAGG-3´ 5´-GAGACCAGAAATGCGCTTGAC-3´	150 pb
DHFR	5´-CAAGGAGCTCATTTTCTTTCCA-3´ 5´-GTTTAAGATGGCCTGGGTGA-3´	148 pb
CCNA2/ciclina A2	5´-TACCTGGACCCAGAAAACCA-3´ 5´-CACTCACTGGCTTTTCATCTTCT-3´	114 pb
CCNB1/ciclina B1	5´-TGTGGATGCAGAAGATGGAG-3´ 5´-TGGCTCTCATGTTTCCAGTG-3´	146 pb
CCNB2/ciclina B2	5´-TTCAACCCACCAAAACAACA-3´ 5´-CTCAGGTGTGGGAGAAGGAC-3´	110 pb
CCNE1/ciclina E1	5´-TTTTTGCAGGATCCAGATGA-3´ 5´-TGCACGTTGAGTTTGGGTAA-3´	166 pb
CCNE2/ciclina E2	5´-GGGAAACATTTTATCTTGCACA-3´ 5´-CTGCAAGCACCATCAGTGAC-3´	178 pb
CDK2	5´-TCCTCCACCGAGACCTTAAA-3´ 5´-TACCACAGGGTCACCACCTC-3´	136 pb
CDKN1A/p21, cip1	5´-GGAAGACCATGTGGACCTGT-3´ 5´-GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA-3´	146 pb

Gen amplificado	Cabadores utilizados	Tamaño del amplicón
CDKN1B/p27,kip1	5´-CCGGCTAACTCTGAGGACAC-3´ 5´-AGAAGAATCGTCGGTTGCAG-3´	120 pb
MLLT11/AF1Q	5´-AGCCCCAACAGCTTTGTA-3´ 5´-GCTACTCACAGGGTCCCTCA-3´	129 pb
BIRC5/Survivin	5´-GTTGCGCTTTCCTTTCTGTC-3´ 5´-TCCGCAGTTTCCTCAAATTC-3´	139 pb
BUB3	5´-GTGGGACTTACGGAACATGG-3´ 5´-CACTCGGCCTTCAATAGAGC-3´	127 pb
BUB1B	5´-CTCGTGGCAATACAGCTTCA-3´ 5´-CAGGCTTTCTGGTGCTTAGG-3´	147 pb
CENPF	5´-AGGCGAGTCAGATCAAGGAG-3´ 5´-GTTCTTGAGTTCTGCCTCCAG-3´	131 pb
KIF2C	5´-TTCACAGTGCCAATGTAAGGA-3´ 5´-GGGTTTATTGCAGCCACATC-3´	121 pb
KIF4A	5´-AACAAGCGTCTCAAGGATGC-3´ 5´-TTTCGTTTCCAAGCCAATTC-3´	121 pb
MAD2L1	5´-CGGACTCACCTTGCTTGTAAC-3´ 5´-TCCAGGACCTCACCACTTTC-3´	147 pb
MCM7	5´-GCCAAGTCTCAGCTCCTGTC-3´ 5´-CCCACCCTCTAAGGTCAGTTC-3´	141 pb
NEK2/NIMA	5´-AGCTTGGAGACTTTGGGCTA-3´ 5´-AGCAGCCCAATGACCAGATA-3´	147 pb
PLK1	5´-CCTCCGGATCAAGAAGAATG-3´ 5´-AGCAGCTCGTTAATGGTTGG-3´	120 pb
WEE-1	5´-CTTCAGCAATGGCACTGGTA-3´ 5´-TTGCCATCTGTGCTTTCTTG-3´	141pb
RPS14	5´-TCACCGCCCTACACATCAAAC-3´ 5´-TCCTGCGAGTGCTGTCAGAG-3´	161pb
STK6/Aurora quinasa A	5´-TTTCCATGATGCTACCAGAGTC-3´ 5´-GGGCATTTGCCAATTCTG-3´	134 pb
STK12/Aurora quinasa B	5´-TCTCTAAGGATGGCCCAGAA-3´ 5´-GCTCATGAGGACAAGTGCAG-3´	138 pb
pEGFP-C1 (vector vacío)	5´- ACGACGGCAACTACAAGACC-3´ 5´-GCTTGTCGGCCATGATATAGA-3´	165 pb
$p14^{ARF}$	5´-AGGAGCCAGCGTCTAGGG-3´ 5´-ACCAGCGTGTCCAGGAAG-3´	177 pb

3.2 Análisis de proteínas.

3.2.1. Análisis por western blot.

Las células se recogieron por centrifugación a 1500 rpm durante 5 min. El sedimento de células se lavó con PBS y se resuspendió en tampón de lisis (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8, 1mM EDTA, 1 % NP40, 20 mM NaF, 1 mM ortovanadato y los inhibidores de proteasas 50 µg/mL PMSF, aprotinina y leupeptina 10 µg/mL). Tras 30 min en hielo se centrifugaron durante 15 min a 14000rpm en microcentrífuga. Se recogió el sobrenadante y se midió la concentración de los lisados por colorimetría según el método

Bradford (Bradford et.al., 1975), empleando seroalbúmina bovina para establecer una recta de calibración. Una vez realizada la medida, se añadió a los lisados tampón 2 x Laemli (100 mM Tris pH 6,8, 4 % SDS, 20 % glicerol y 8 % 2-Mercaptoetanol) con 0,005 % azul de bromofenol. Las proteínas se calentaron a 95º C durante 5 min y se fraccionaron mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida-SDS, de un porcentaje adecuado al tamaño de la proteína a analizar: 8 % para ABL, c-Kit, PARP y EGFR, 10 % para Myc, p53, p57, Mdm2, AKT, ERK, SRC, β-Actina y α-Tubulina y 12 % para p27, p21, Bcl2 y Bax. Se usó un aparato Mini-protean (Bio-Rad) y un tampón 25mM Trizma base, 192 mM Glicina y 1% (w:v) SDS. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Schleider and Schuell), durante 2 h a 2,5 mA/cm^2 en una aparato Mini Protean IITM (Bio-Rad) en un tampón 25 mM Trizma base, 192mM Glicina y 10 % Metanol.

Tras la transferencia, las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación en una solución bloqueante TBS-T (Tris Buffer Saline Tween 20: 20 mM Tris base pH 7,5, 137 mM NaCl y 0,05% o 0,1 % Tween 20, dependiendo de la especificidad del anticuerpo utilizado) con un 5 % de reactivo bloqueante (Amersham) para bloquear la unión a sitios inespecíficos. Seguidamente, se incubaron las membranas con anticuerpo primario (1-5 µg/mL) diluido con una soluión TBS-T con 2 % BSA durante 1-4 h a temperatura ambiente con agitación. Tras la incubación se realizaron 2 lavados con TBS-T durante 15 min cada uno a temperatura ambiente y con agitación. Posteriormente, se incubaron las membranas con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (dilución 1/5000-1/20000) en una solución TBS-T con 2 % BSA durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación. Se volvieron a realizar dos lavados de 15 min cada uno con TBS-T. Por último se procedió a la detección de la proteína por quimioluminiscencia utilizando el Kit de ECL TM (Amersham). Los filtros se cubrieron con film transparente y se autorradiografiaron en películas Kónica- Minolta.

Para poder reutilizar los filtros y reincubarles con otros anticuerpos, se lavaron con una solución de 0,2 M glicina pH 2,5 durante toda la noche y se lavaron con una solución de TBS-T durante 30 min.

Tabla 3.5 Anticuerpos usados para Western blot.

Nombre	Antígeno	Tipo	Dilución de uso	Procedencia (Referencia)
Anti-p53	p53 humano (proteína completa)	Policlonal de conejo	1:250	Santa Cruz (FL-393)
Anti-p-p53 (ser15)	p-Ser15-p53 (oligopéptido)	Policlonal de conejo	1:1000	Cell Signaling (9919)
Anti-p-p53 (ser6)	p-ser6-p53 (oligopéptido)	Policlonal de conejo	1:1000	Cell Signaling (9919)
Anti-p-p53 (ser9)	p-ser9-p53 (oligopéptido)	Policlonal de conejo	1:1000	Cell Signaling (9919)
Anti-p-p53 (ser20)	p-ser20-p53 (oligopéptido)	Policlonal de conejo	1:1000	Cell Signaling (9919)
Anti-p-p53 (ser37)	p-ser37-p53 (oligopéptido)	Policlonal de conejo	1:1000	Cell Signaling (9919)
Anti-p-p53 (ser46)	p-ser46-p53 (oligopéptido)	Policlonal de conejo	1:1000	Cell Signaling (9919)
Anti-p-p53 (ser392)	p-se(r392)-p53 (oligopéptido)	Policlonal de conejo	1:1000	Cell Signaling (9919)
Anti-p21	p21 humano (C-terminal)	Policlonal de conejo	1:250	Santa Cruz (C-19)
Anti-p21	p21 humano (N-terminal p21)	Monoclonal de ratón	1:500	Sigma (P-1484)
Anti-p27	p27 humano (C-terminal p27)	Policlonal de conejo	1:250	Santa Cruz (C-19)
Anti-p57	p57 humano	Monoclonal de ratón	1µg/uL	BD Pharmingen (556346)
Anti-Mdm2	Mdm2 Human (aa 154-167)	Monoclonal de ratón	1:250	Santa Cruz (SMP14)
Anti-Bax	Bax human (aa 43-61)	Policlonal de conejo	1:1000	BD Pharmingen (554104)
Anti-Bcl2	Bcl-2 humano (aa 41-54)	Monoclonal de ratón	1:200	Santa Cruz (sc-509)

Nombre	Antígeno	Tipo	Dilución de uso	Procedencia (Referencia)
Anti-cKit	c-Kit humano (N-terminal)	Monoclonal de ratón	1:1000	BD Transduction Lab (612318)
Anti-Abl	Abl Humano	Monoclonal de ratón	2 µg/µL	BD Pharmingen (554104)
Anti-EGFR	EGF-R Humano (C-terminal)	Monoclonal de ratón	1:1000	Cell Signaling (1-F4)
Anti-p-Tyr	p-Tyr Humano	Monoclonal de ratón	1:500	Santa Cruz (s-508)
Anti-PARP	PARP Humano (aa 760-1014)	Policlonal de Conejo	1:1000	Santa Cruz (H-250)
Anti-p-Akt	p-Ser473-Akt (oligopéptido)	Policlonal de Conejo	1:1000	Cell Signaling (9271)
Anti-Akt 1/2	Akt Humano (aa 345-480)	Policlonal de conejo	1:1000	Santa Cruz (H-136)
Anti-p-Src	p-Tyr418 -Src (oligopeptido)	Policlonal de conejo	1:1000	BioSource (44-660G)
Anti-c-Src2	Src Humano (C-terminall)	Policlonal de conejo	1:1000	Santa Cruz (SC-18)
Anti-p-Erk1/2	pThr202/Thr204-Erk (oligopéptido)	Policlonal de conejo	1:1000	Cell Signaling
Anti-Erk2	Erk Humano Subdominio XI	Policlonal de conejo	1:1000	Santa Cruz (C-14)
Anti-c-Myc	c-Myc Humano (aa 1-262)	Policlonal de conejo	1:250	Santa Cruz (N-262)
Anti-Tubulina	α-Tubulina Humana	Policlonal de conejo	1:1000	N.Cowan, New York University
Anti-Actina	α-Actina Humana (C-terminal)	Policlonal de cabra	1:500	Santa Cruz (I-19)
Anti-Mouse HRP	IgG de Raton	Cabra	1:5000	Amersham (NA 931)
Anti-Rabbit HRP	IgG de conejo	Cabra	1:10000	BioRad
Anti-Goat HRP	IgG de cabra	Raton	1:8000	Sigma (A 5420)

3.2.2.Inmunoprecipitación.

Las células se recogieron mediante precipitación, se lavaron con PBS frío, y se lisaron durante 2 h a 4º C en una solución Hepes 7,5, 25mM EGTA, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 % glicerol, 0,2 % Tween 20, e inhibidores de fosfatasa y proteasas 20mM NaF, 10 µg/mL aprotinina, 1 mM ortovanadato, 50 µg/mL PMSF y 10 µg/mL leupeptina. Una vez lisadas se centrifugaron a 12000 rpm en una microcentrífuga refrigerada a 4º C durante 30 min. Las proteínas totales se determinaron mediante el método DC de Bio-Rad. 1 mg de proteína total se incubó con 5 µg de anticuerpos anti-c-Kit (BD Pharmingen ™) y anti-Abl (BD Pharmingen ™) durante toda la noche en un roller a 4º C. Los lisados se incubaron con Proteína A-Agarosa durante 2 h a 4º C. Los inmunocomplejos precipitados se lavaron 4 veces con un 1mL solución de lisis y una vez con PBS. Finalmente se resuspendieron en un volumen 2x Laemmli y se incubó durante 5 min a 95º C. Las proteínas resultantes del inmunoprecipitado se resolvieron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS, se transfiere a membrana de nitrocelulosa y se expusieron en películas Kónica-Minolta.

3.2.3 Inmunofluorescencia.

Las células se crecieron sobre cubreobjetos de vidrio de 10 mm de diámetro que previamente habían sido esterilizados. Las células se fijaron con una solución de paraformaldehído al 3,7 % en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se permeabilizaron con una solución que contiene tritón x 100 al 0,5 % y glicina 0,1M en PBS durante 20 min. A continuación se realizaron dos lavados con PBS de 5 min cada uno y las células se incubaron con una dilución 1/100 del anticuerpo anti-p21 (C-19) y 1/1000 del anticuerpo H2AX (Upstate 05-636) durante una noche a 4º C. Tras esta incubación se lavaron dos veces con PBS 5 min cada vez y se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con FITC (Dako). Las muestras se montaron con Vectashield (Vector Laboratorios) que contiene 4´-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para teñir los núcleos. Las muestras se examinaron mediante microscopía de fluorescencia (Zeiss Axioscope).

3.3 Cultivos Celulares.

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo se recogen en la tabla 3.6:

Tabla 3.6.

Línea Celular	Origen	Antibióticos *	Procedencia/Referencia
HCT116WT	Carcinoma colorectal		Waldman et al 1995
HCT116p53$^{-/-}$	Carcinoma colorectal	0,4 mg/mL G418 y 0,1 mg/mL higro.	Bunz et al 1998
HCT116p21$^{-/-}$	Carcinoma colorectal	0,4 mg/mL G418 y 0,1 mg/mL higro	Waldman et al 1995
HKO-MTp21	Carcinoma colorectal	0,4 mg/mL G418, 0,1 mg/mL higro, 0,25 µg/mL puro.	Esta Tesis
HCTKO-DDp53	Carcinoma colorectal	0,4 mg/mL G418, 0,1 mg/mL higro, 0,25 µg/mL puro	Esta Tesis
HCT116-shp21	Carcinoma colorectal	0,5 µg/mL puro	Esta Tesis
HCTKO-shp53	Carcinoma colorectal	0,5 µg/mL puro	Esta Tesis
HCT116WTMyc-ER	Carcinoma colorectal	0,5 µg/mL puro	Esta Tesis
HCT116p53$^{-/-}$Myc-ER	Carcinoma colorectal	0,4 mg/mL G418, 0,1 mg/mL higro, 0,5 µg/mL puro	Esta Tesis
HCT116p21$^{-/-}$Myc-ER	Carcinoma colorectal	0,4 mg/ml G418, 0,1 mg/mL higro, 0,5 µg/mL puro	Esta Tesis
K562	Leucemia Mieloide Crónica		ATCC
Kp21-4	Leucemia Mieloide Crónica	0,25 mg/mL G418	Colección del laboratorio, Munoz-Alonso et al 2005
Kp27-5	Leucemia Mieloide Crónica	0,25 mg/mL G418	Colección del laboratorio Munoz-Alonso 2005
HeLa	Carcinoma Cervical		Colección del laboratorio
MO7	Leucemia Mieloide Aguda		Colección del laboratorio

* G418= Geneticina, higro= Higromicina B, puro= Puromicina

Las células HCT116 y sus derivadas, así como las células K562 y sus derivadas se crecieron en medio RPMI 1640 (Invitrogen) con 8 % de suero fetal de ternera (FCS) (Biochrome) y 80 µg/ml de gentamicina a 37º C, 5 % CO_2. Los MEFS se crecieron en Dulbecco´s modified Eagle´s médium (DMEM) suplementado con 8 % FCS y 80 µg/mL de gentamicina a 37º C, 5 % CO_2. Todos los cultivos se mantuvieron en fase exponencial de crecimiento por debajo de 5 x 10^5 células/mL.

3.3.1 Obtención de sublíneas transfectantes estables.

Las células HKO-MTp21 se obtuvieron co-transfectando las células HCT116 $p21^{-/-}$ con los vectores pMT-CB6-p21 y pLPCX (proporción 6:1) y usando Lipofectamine™ (Invitrogen). Esta co-transfección permitió seleccionar las células que presentaban resistencia a puromicina. Tras aproximadamente 10-15 días en presencia del antibiótico (0,25 µg/µl de puromicina) se obtuvieron colonias puntuales que fueron aisladas y expandidas. Se obtuvieron alrededor de 30 clones y se seleccionaron aquellos que presentaba expresión ectópica e inducible de p21 en respuesta a 50 µM $ZnSO_4$ analizado por Western blot.

La sublínea HCTKO-DDp53 se obtuvo co-transfectando las células HCT116 $p21^{-/-}$ con los vectores pcDNA3DDp53 y pLPCX (en proporción 3:1) y usando Lipofectamine™ (Invitrogen). 24 horas tras la transfección se añadió puromicina (0,5 µg/ml concentración final) durante 10 días. Las colonias resistentes a puromicina se seleccionaron y se expandieron como clones individuales en un medio de cultivo RPMI 1640 con 8% FCS y 0,5 µg/mL puromicina. Se analizaron 22 clones y se seleccionaron aquellos que presentaba expresión ectópica de DDp53 analizada por Western blot.

Para la generación de sublíneas HCT116Myc-ER, que presentan una sobreexpresión de Myc se usó el vector de expresión retroviral pBabe-puro-MycER que contiene el gen de resistencia a puromicina. Tras 24 horas de infección se seleccionó con 0,5 µg/mL de puromicina y se obtuvo un “pool” de cada una de las líneas HCT116 (WT, $p53^{-/-}$ y $p21^{-/-}$). Para inducir la actividad MycER se incubaron las células con 100 nM 4-hidroxi-tamoxifeno (4OHT). Paralelamente se obtuvieron líneas infectadas con el vector vacío pBabe-Puro como control de la expresión de Myc

Para la generación de sublíneas estables con expresión estable de RNAs de interferencia se utilizaron los plásmidos (pRetroSuperp21, pRetroSuper (v), pSuperRetrop53, pSuperRetro (v)) Los retrovirus usados para la generación de estas

sublíneas se obtuvieron con las células empaquetadoras Phoenix-A que fueron transfectadas por el método de co-precipitación por fosfato cálcico con 20 µg de los distintos plásmidos y siguiendo el protocolo de "Retroviral System Nolan Lab" (http://www.stanford.edu/group/nolan/). 24 h después de la transfección se recogió el medio y se filtro el sobrenadante. Posteriormente, se añadió 6 mL de este sobrenadante, que contenían los virus, a las placas de las células HCT116 a una densidad de 2 x 10^6 células en presencia de 5 µg/mL de polibreno (Sigma). Después de 48 h de incubación con los retrovirus, las células se lavaron y se seleccionaron durante 2-3 semanas en presencia de 1 µg/mL de puromicina y posteriormente la expansión de cada sublínea celular se realizó a 0,5 µg/mL.

La sublínea HCT-shp21 se obtuvo tras la infección con el vector de expresión retroviral pRetroSuperp21. La inhibición de expresión de la proteína p21 se determinó por Western blot. Paralelamente se generó una sublínea HCT-pRS con retrovirus pRetroSuper como línea control.

La sublínea HCTKO-shp53 se obtuvo tras la infección con el vector de expresión retroviral pSuperRetrop53. La inhibición de la expresión de la proteína p53 se determino por Western blot. Paralelamente se generó una sublínea HCTKO-pSR con retrovirus pSuperRetro como línea control de nuestros experimentos.

3.3.2 Transfecciones transitorias.

Para las transfecciones transitorias en K562 se utilizó Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) y para HCT116p21$^{-/-}$ se utilizó Lipofectamine™ (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Las líneas HCT116WT y HCT116WTMyc-ER se transfectaron con FuGene 6 (Roche) siguiendo las indicaciones del fabricante.

-La línea K562 (12 x 10^6) fue transfectada en una placa de cultivo p-100 con 12 µg DNA de los plásmidos p21-WT, p21-CT y p21-NT fusionados a la proteína verde fluorescente GFP y 30 µL de Lipofectamine™ 2000. A su vez también se transfectaron los plásmidos control GFP. 12 h después de la transfección las células se seleccionaron mediante citometría de flujo con un FACSAria™ (BD Biosciencies), de esta manera los resultados se realizaron solo sobre la población positiva para GFP.

-Las líneas HCT116WT y HCT116WTMyc-ER (5 x 10^5 células) fueron transfectadas en una placa de cultivo T-6 con 2 µg totales de DNA de los plásmidos (M4-

Luc, pCEFLMyc, pR-Null) y 3 µl de FuGene en una proporción (3:2). A las 18 horas de la transfección se añadió 100 nM 4OHT y 36 h después de haber sido transfectado se recogieron las células para realizar el ensayo luciferasa. El ensayo luciferasa se realizó como aparece descrito en el apartado 3.3.4.

- La línea HCT116p21$^{-/-}$ (1 x 10 ^{6} células en placa p60) fue transfectada con 1,5 µg DNA de los plásmidos (pG13-Luc, pGL3-Mdm2-Luc, pGL3-p21-Luc, pGL-3 y pR-Null) y 3 µl de Lipofectamine. A las 36 horas de la transfección se realizó el ensayo luciferasa como aparece descrito en el apartado 3.3.4.

- La línea HCT116 (2,5 x 10 ^{6} células) fue infectada en una placa de cultivo p-100 con adenovirus de la proteína completa p21, esta construcción estaba unida a la proteína GFP y ello nos sirvió como control de la infección a las 24 horas. La infección se realizó durante 1 h en un mL medio de crecimiento RPMI-8% FCS que contenía la concentración adecuada de virus, cada 15 min durante esa hora las células eran agitadas en la placa de cultivo. Después de esa hora se añadió medio de cultivo hasta completar los 6 mL. Tras 24 horas se observó que alrededor del 80 % de células infectadas y se analizó la expresión de la proteína p21 por western blot.

3.3.3 Ensayos Luciferasa.

Para determinar la actividad de p53 se utilizaron promotores de genes regulados por p53 como son p21-Luc, Mdm2-Luc y un promotor artificial que presenta 13 lugares de unión para p53 (pG13-Luc) estos promotores controlan la expresión del gen reportero de la luciferasa de Firefly.

Una vez realizadas las distintas transfecciones en transitorio (36-48 h) se lavaron las células con PBS y se lisaron sobre las placas con 300 µL de la solución de lisis PLB (“passive lysis buffer”). Una vez lisadas y despegadas bien las células, los lisados se congelaron brevemente a -70º C. El lisado se centrifugó a 14000 rpm durante 30 segundos para clarificarlo. El ensayo luciferasa se realizó utilizando el Kit “Dual Luciferase reporter assay system” (Promega TM040) según las especificaciones del fabricante. en un luminómetro TD-20/20 (Turner).

3.3.4 Experimentos de proliferación y viabilidad celular.

3.3.4.1 Viabilidad celular por azul tripano.

El crecimiento celular (número de células inicial 2 x 10^5 células/mL) se determinó por un recuento diario de hasta 4 días con un hemocitómetro. La viabilidad celular se analizó por exclusión de la tinción de azul de tripan (Sigma).

3.3.4.2 Viabilidad celular por ensayos de WST-1.

Se realizaron ensayos de reducción de la sal de tetrazolio WST-1 para determinar la actividad metabólica de las células. Siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche). Las células se crecen en placas de cultivo T-96 a una concentración final de 5-10 x 10^3 células/ pocillo durante 48 h.

Una vez estaban adheridas las células a la placa de cultivo se indujo p21 con 50 µM $ZnSO_4$ y 90 min después se añadió imatinib a distintas concentraciones. Cada pocillo se incubó con 10 µL de WST-1 durante 2 h a 37º C y la absorbancia se midió a 405 nm. Las medidas se realizaron a 24 h y a 48 h de aplicar los tratamientos a las células de cultivo. Como blanco de las medidas se utilizó medio de cultivo con WST-1 sin células.

3.3.4.3 Ensayos de formación de colonias.

Los ensayos clonogénicos en la línea HCT116 y sus sublíneas se realizaron en placas de cultivo T-6 (5.000 células por pocillo) o T-12 (8.000 células por pocillo).

Una vez las células estaban adheridas a la placa de cultivo se aplicaron las distintas concentraciones de los distintos tratamientos (imatinib, gefitinib y adriamicina). El experimento se mantuvo hasta que la densidad celular en los controles estaba alrededor del 90%. Cada 48 h se cambiaba el medio de cultivo y se aplicaba de nuevo el tratamiento.

Se realizó un experimento dosis-respuesta en T-6 donde aplicábamos una dosis de 10 µM de imatinib durante 24 horas. Pasado este tiempo las células se lavaban con PBS 1x y se aplicaba nuevo medio de crecimiento RPMI 1640 -8 % FCS. Los recuentos

celulares se realizaron a las 24 horas de tratamiento y en los siguientes tres días cada 24 h desde que se eliminó el tratamiento.

Posteriormente las células fueron fijadas y teñidas con 1 % cristal de violeta (en metanol) ó 0,1 % con Azul de Coomasie (en metanol:acético) durante 10 min. Para su cuantificación las placas teñidas con cristal de violeta se destiñeron con 10 % de ácido acético y se midió la absorbancia a 590 nm.

3.3.5. Determinación de la apoptosis.

3.3.5.1 Análisis de la fase sub Go-G1 del ciclo celular.

El análisis del ciclo celular se realizó mediante yoduro de propidio, que se intercala en el DNA y permite determinar el contenido de DNA en las distintas fases del ciclo. Ello incluye la fase sub-Go, donde se acumulan células en apoptosis. Las células (0,5 $x10^6$) se centrifugaron a 1500 rpm 5 min y se lavaron con 5 mL de PBS frío. Las células se resuspendieron en 500 µL de PBS frío y se fijaron con 4,5 mL de etanol absoluto a 4º C. Este se fue añadiendo lentamente y en agitación hasta una concentración final de 90% de etanol. Tras 30 min en hielo, las células se centrifugaron a 1000 rpm 5 min y se lavaron con 5 mL de PBS conteniendo 200 µg/mL RNAsa A libre de DNAsa y 10 µg/mL de yoduro de propidio y se incubaron durante 30 min a 37º C protegidas de la luz. Las células así teñidas se analizaron mediante citometría de flujo en un citómetro FACScan (BD Biosciences).

3.3.5.2 Análisis de apoptosis por unión Anexina-V.

Anexina V es una proteína que se une a fosfolípidos de membrana y tiene una alta afinidad por la fosfatidilserina (PS) (Raynal. P et al., 1994), la cual queda expuesta en la cara externa de la membrana celular en células en estadíos tempranos de apoptosis. Por otra parte el 7-Amino-actinomicina (7-ADD) es un colorante vital que marcaría solo muerte celular o apoptosis tardía. La unión a anexina V y tinción con 7-ADD se llevó a cabo con el “Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit” (BD Pharmingen). Las células (0,5 $x10^6$) se centrifugaron a 1500 rpm 5 min y se lavaron con 5 mL de PBS frío. Las células se resuspendieron en 100 µL de tampón de anexina (0,1 M Hepes/NaOH pH 7,4, 1,4 M NaCl, 25 mM $CaCl_2$) y se añadieron 2 µL de Anexina V y 2 µL de 7-AAD. Se agitaron las células y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad y se

añadió 400 µL más del mismo tampón por tubo. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACScan (BD Biosciences).

3.3.5.3 Proteolísis de la proteína PARP.

PARP es una poly(ADP-ribosa)polimerasa que modifica varias proteínas nucleares por poly(ADP-ribosilación). PARP sufre rotura proteolítica por caspasas cuando las células sufren daño en el DNA, esa ruptura se produce entre los aminoácidos 214 y 215 generándose un fragmento de 85 kDa, está ruptura es un síntoma temprano de apoptosis. La ruptura de la proteína PARP se observó por western blot, y el anticuerpo usado está descrito en la tabla 3.5.

3.4 Tratamientos con fármacos.

3.4.1 Tratamiento con imatinib.

Como se describió en la introducción (ver Introducción 1.5), el imatinib es un inhibidor de las actividades tirosina-quinasa de Bcr-Abl (proteína de fusión producto de la t(9,22) en la leucemia mieloide crónica), c-Kit/CD117 (receptor tirosina quinasa del factor SCL o Kit-ligando) y PDGF-R (receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas).

Este fármaco se ha usado a lo largo de esta Tesis para determinar los efectos de un inhibidor tirosina-quinasa en cancer colorectal. Se han usado distintas concentraciones de imatinib (stock disuelto en agua y almacenado en alícuotas a -20 º C). El imatinib fue proporcionado por Novartis.

3.4.2 Tratamiento con gefitinib

Es un inhibidor de la actividad tirosina-quinasa de EGF-R (Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano) que impide la transducciones de señales implicadas en la proliferación y supervivencia de células cancerosas.

Este fármaco ha sido usado a distintas concentraciones (stock disuelto en DMSO y almacenado en alícuotas a -20º C). El gefitinib fue suministrado por AstraZeneca.

3.4.3.Tratamiento con adriamicina (doxorubucina).

Es un fármaco antitumoral que inhibe a la topoisomerasa II. Se une directamente a los ácidos nucleicos, mediante la intercalación en la doble hebra del DNA y ello provoca la inhibición de la síntesis de DNA.

En esta Tesis se utilizó como control positivo de apoptosis en HCT116 y derivadas, siguiendo las indicaciones de trabajos publicados anteriormente Se utilizaron distintas concentraciones (stock disuelto en agua y almacenado en alícuotas a -20º C protegidas en todo momento de la luz). La adriamicina fue obtenida de Sigma.

3.4.4 Tratamiento con 5-fluoracilo.

Es un fármaco anticanceroso del tipo de los antimetabolitos y perteneciente al grupo de los análogos de pirimidina. El 5-fluoracilo inhibe la síntesis del DNA.

En esta Tesis se utilizó como control positivo de apoptosis. Se utilizaron distintas concentraciones (Stock disuelto en agua y almacenado en alícuotas a -20º C). El 5-fluoracilo fue obtenido de Sigma.

3.5 Preparación de extractos de muestras de cáncer colorectal.

Se analizó por western blot la expresión de las proteínas p21, p27, p57 y c-Myc en muestras de cáncer colorectal.

Las muestras clínicas fueron suministradas por el Servicio de Anatomía Patológica del hospital Marqués de Valdecilla, en colaboración con la Dra. Carmen González Vela y el Dr Jorge Cuevas. Las muestras suministradas provenían de pacientes afectados con cáncer colorectal, de los cuales se toman muestras de tejido tumoral y de tejido sano colorectal. El estadío de cada tumor fue proporcionado por el Dr. Rivera del Servicio de Oncología del Hospital Marqués de Valdecilla.

Las biopsias llegaron al laboratorio en criotubos y en hielo seco, eran pesadas en una balanza de precisión y se obtenían entre 50-100 mg que pulverizábamos en un mortero de porcelana y con hielo seco. Una vez reducido se lisaban con el buffer de lisis 2x Laemmli (100 mM Tris pH 6,8, 4 % SDS, 20 % glicerol) sin el 8 % de Mercaptoetanol (v:v) y sin 0,1 % de azul de bromofenol que se añade en cada uno de los lisados justo en

el momento antes de la electroforesis. Los volúmenes finales de tampón de lisis que se usaron fue en función del peso (300 µL de buffer de lisis por cada 50 mg de tejido).

Una vez lisado se homogenizó en un Polytron (de 1mm) con dos pulsos de 3-5 segundos, tras cada pulso se realizó una centrifugación a 13000 rpm durante 10 seg para clarificar. Posteriormente, se volvió a centrifugar 13000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Se recoge el sobrenadante en un nuevo eppendorf y se separó 10 µL para cuantificar proteínas por el método “DC Protein Assay” (BioRad). Al resto de lisados se le añadió el 8 % de mercaptoetanol (v:v) y el 0,1 % de azul de bromofenol. Se calentó 5 minutos a 95º C y se realizó el western blot como viene descrito en el apartado 3.2.

4.~ RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Papel de p21 en respuesta a inhibidores de tirosina-quinasas

4.1.1. Efectos de imatinib en proliferación y apoptosis de cáncer colorectal.

Uno de los objetivos de esta Tesis fue estudiar el papel de p21 en la respuesta a fármacos inhibidores de tirosina-quinasa. Para ello, analizamos primero los efectos del fármaco imatinib en cáncer colorectal (CCR). Escogimos como modelo celular la línea HCT116 en base a un trabajo previo que sugirió al receptor tirosina-quinasa c-Kit como diana terapéutica de imatinib (Attoub et al., 2002). Además, el modelo celular HCT116 ofrecía la posibilidad de estudiar los efectos en presencia y ausencia de p21 o p53, ya que se disponía de sublíneas con mutación de p21 (HCT116p21$^{-/-}$) (Waldman et al., 1995) o de p53 (HCT116p53$^{-/-}$) (Bunz et al., 1998). Estas mutaciones fueron corroboradas en las líneas usadas en nuestro trabajo (fig 4.1).

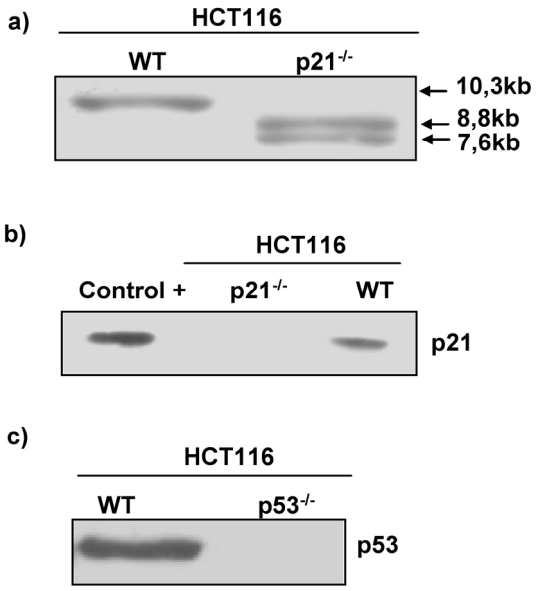


Fig 4.1 Confirmación de las delecciones de p21 y p53 en sublíneas celulares HCT116. a) La delección de p21 en la línea celular HCT116p21$^{-/-}$ se analizó mediante southern blot usando como una sonda del promotor de p21. Se observan los alelos silvestres WT (10,3 Kb), el alelo Neo (8,8 kb) y el alelo Hyg (7,6 kb) los dos alelos mutados de p21 (ver 3.1.4). b) Confirmación de la mutación de p21 mediante western blot con anticuerpos anti-p21. El control positivo utilizado fue la línea Kp21 (Munoz-Alonso et al., 2005), con expresión ectópica p21. También se usó como control la línea WT. c) Confirmación de la mutación de p53 mediante western blot con anticuerpos anti-p53.

4.1.1.1. Efecto de imatinib en proliferación celular.

En primer lugar, estudiamos la sensibilidad al imatinib de células parentales (HCT116WT) y de células deficientes en p21 (HCT116p21$^{-/-}$) o en p53 (HCT116p53$^{-/-}$),

mediante ensayos dosis-respuesta a distintas concentraciones de imatinib (fig 4.2). Este experimento se realizó en paralelo con otro inhibidor de tirosina-quinasa como es gefitinib (con mayor especificidad para EGF-R). Gefitinib utiliza el mismo mecanismo de acción que imatinib y es usado para el tratamiento de cáncer de pulmón no microcítico NSCLC (revisado en Frampton and Easthope, 2004). Podemos observar que las células deficientes en p21 son mucho más sensibles a ambos inhibidores tirosina-quinasas, si comparamos con las células parentales y las células p53$^{-/-}$ (fig 4.2.a.). Este efecto también se observa en células tratadas con dos fármacos genotóxicos, ADR y 5-FU, como se ha descrito previamente (Bunz et al., 1999; Javelaud and Besancon, 2002). Estos fármacos se usaron como control de nuestros experimentos (fig 4.2.b).

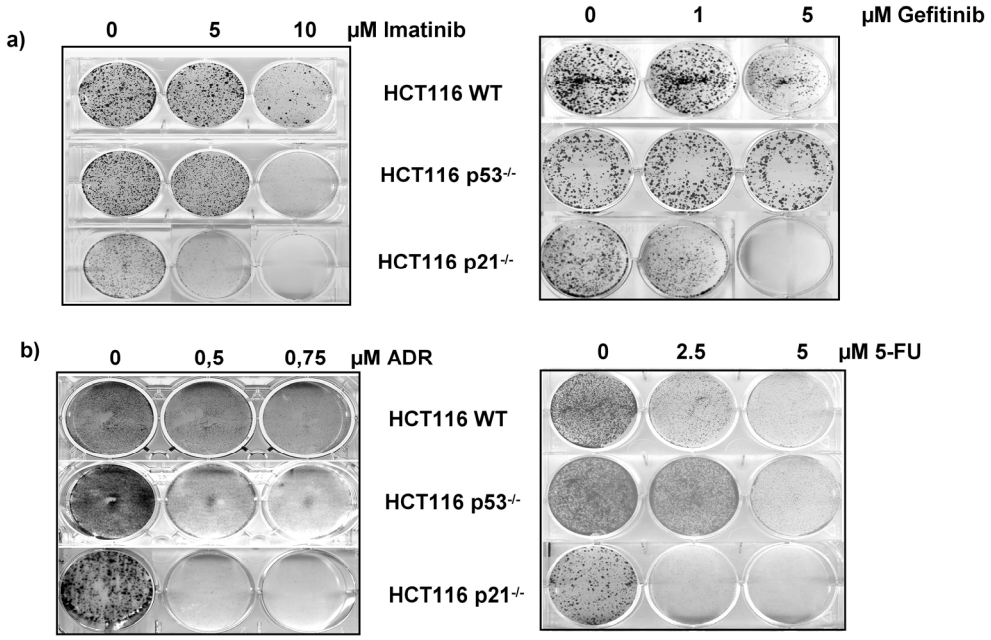


Fig 4.2 Ensayos dosis-respuesta de las líneas HCT116 con fármacos genotóxicos e inhibidores de tirosina-quinasa. a) Ensayos de formación de colonias de las líneas HCT116WT, p53$^{-/-}$ y p21$^{-/-}$ tratadas con inhibidores de tirosina-quinasa (imatinib y gefitinib), a) Ensayos de formación de colonias de las líneas HCT116WT, p53$^{-/-}$ y p21$^{-/-}$ tratadas con fármacos genotóxicos (ADR y 5-FU). El tratamiento se aplicó hasta obtener una densidad celular del 80 % en las células sin tratar. Posteriormente se tiñeron con 1% de cristal violeta.

El efecto anti-proliferativo de imatinib en HCT116p21$^{-/-}$ es debido a la citotoxicidad, como lo demuestra el hecho, de que las células HCT116p21$^{-/-}$ no reanudan su

proliferación celular si eliminamos el fármaco del medio de cultivo mediante lavado después de 24 horas de tratamiento (fig 4.3).

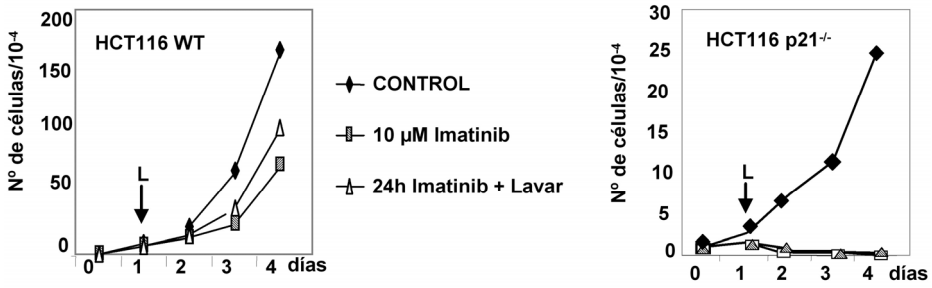


Fig 4.3 Ensayos de citotóxicidad en las líneas celulares HCT116 WT y HCT116 p21$^{-/-}$. Las células se crecieron en ausencia (control) o presencia de 10 µM de imatinib. Paralelamente se incubó un cultivo con 10 µM imatinib durante 24 h, se lavó (L) y se incubaron durante 3 días más con medio sin imatinib. Los recuentos celulares se realizaron en un hemocitómetro.

4.1.1.2 Estudio de la apoptosis inducida por imatinib.

Para tratar de elucidar si el efecto citotóxico de imatinib en células deficientes en p21, era a través de la inducción de apoptosis, realizamos distintos ensayos. Mediante técnicas de citometría de flujo, analizamos el porcentaje de células en la fase SubG0 (marcador de apoptosis) en cada una de las líneas HCT116 (fig 4.4).

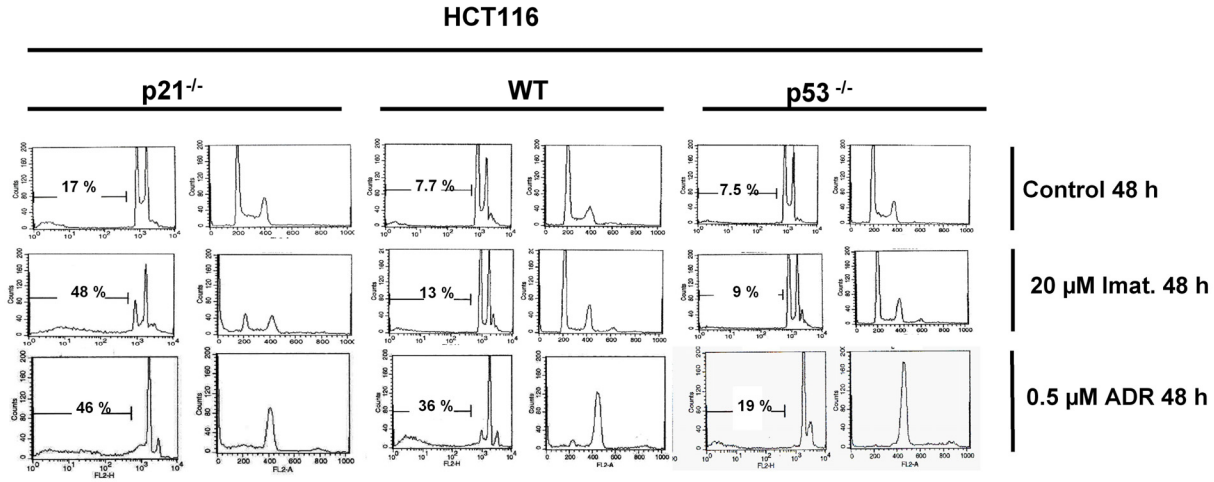


Fig 4.4 La línea HCT116p21$^{-/-}$ presenta una mayor población de células en la fase Sub-G0. Citometrias de flujo de las células HCT116, donde se muestra en los histogramas el contenido de DNA de las células tras la tinción con yoduro de propidio. Las células se trataron durante 48 con Imatinib o ADR. En los paneles se muestra el tanto por ciento de células en la fase Sub-G0 del ciclo celular. Representación líneal (derecha) y representación logarítmica (izquierda). Se muestra un experimento representativo de tres realizados.

El resultado demostró un elevado porcentaje de células en la fase SubG0 en la línea celular HCT116p21$^{-/-}$ en presencia de imatinib. Este resultado era muy similar al obtenido con el fármaco control de nuestros experimentos (ADR). Sin embargo, el porcentaje de celulas en la línea parental o en la deficiente en p53 era menor.

Además, estudiamos mediante western blot la rotura proteolítica de la proteína PARP, un marcador de apoptosis (ver 3.3.5.4). En la figura 4.5.a se observa la rotura de PARP, en las células HCT116p21$^{-/-}$ tratadas con imatinib a dosis de 15 µM y 20 µM. Esta rotura no se producía en las células parentales, ni en células mutadas para p53$^{-/-}$ (fig 4.5.b y 4.5.c, respectivamente). La rotura proteolítica de PARP, también se observó cuando las células HCT116p21$^{-/-}$ se trataron con ADR como control positivo de apoptosis.

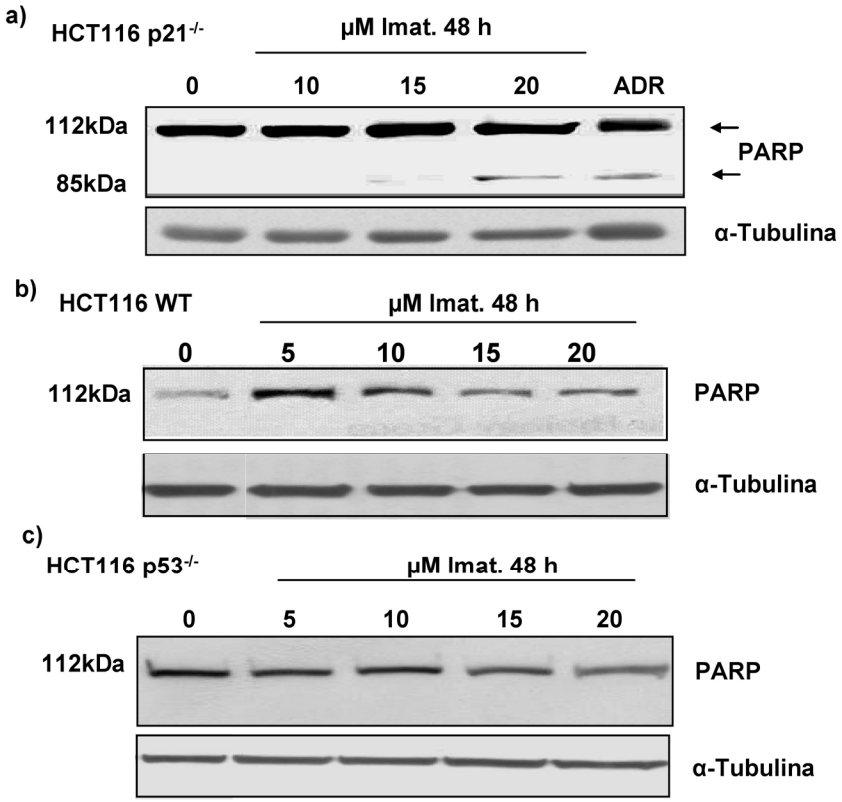


Fig 4.5 Análisis de la apoptosis medida por la rotura de la proteína PARP. Las células HCT116 (WT, p53$^{-/-}$ y p21$^{-/-}$) fueron tratadas con imatinib a dosis 10, 15, 20 µM durante 48 h. Posteriormente se analizó la rotura de PARP mediante western blot. a) La línea delecionada para p21 presenta rotura proteolítica de PARP observándose dos fragmentos (112 kDa y 85 kDa). El control positivo son las células tratadas con 1 µM ADR durante 24 h. b) La línea parental presenta un único fragmento de PARP. c) La línea delecionada para p53 presenta un único fragmento de 112 kDa de PARP. Como control de carga se utilizó la α-Tubulina.

Por último, medimos la externalización de fosfatidilserina mediante la unión a anexina V (un marcador de apoptosis temprana). Las células mutadas para p21 presentaban un mayor porcentaje de células anexina positivas que las células HCT116WT y las células HCT116p53$^{-/-}$ (fig 4.6).

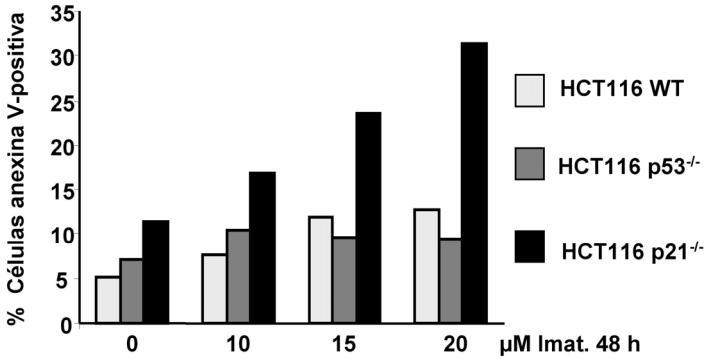


Fig 4.6 La línea celular HCT116p21$^{-/-}$ presenta mayor unión a anexina-V. Determinación del porcentaje de células anexina V-positivas mediante citometría de flujo. Las células HCT116 fueron tratadas durante 48 h con dosis crecientes de imatinib. Se muestra un experimento representativo de tres realizados.

Estos resultados, sugerían que p21 tenía un efecto protector de la apoptosis provocada por imatinib. Los efectos de imatinib, a pesar de su actividad bioquímica como inhibidor de tirosina-quinasa podrían ser explicados por un mecanismo genotóxico no descrito para esta molécula. Para explorar está hipótesis, analizamos por inmunofluorescencia la fosforilación de la histona H2AX (un marcador universal de daño genómico) (Thiriet and Hayes, 2005) (fig 4.7).

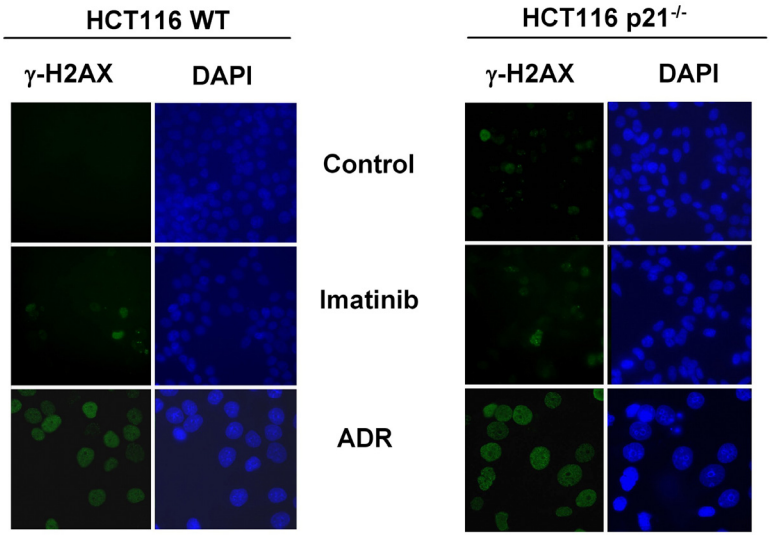


Fig 4.7 Las células tratadas con imatinib no presentan fosforilación de la histona H2AX . Imagen de microscopia de fluorescencia de células HCT116 WT y HCT116p21$^{-/-}$ tratadas con 15μM imatinib o 0,5μM ADR durante 48 h y posteriormente, incubadas con un anticuerpo contra γ-H2AX o teñidos los núcleos celulares con DAPI .

El resultado demuestra que las células tratadas con imatinib no presentan marcaje de γH2AX (H2AX fosforilada), mientras que las células tratadas con ADR, conocido agente genotóxico, si presentan este marcaje. Por lo tanto, el efecto citotóxico causado por imatinib no es consecuencia de daño al DNA.

4.1.1.3 Análisis de posibles dianas celulares de imatinib

A continuación, realizamos un estudio de posibles dianas intracelulares para imatinib en el modelo celular HCT116. Como primera aproximación, estudiamos aquellas quinasas descritas como dianas de imatinib. Se pudo observar la inhibición de la fosforilación sobre Abl (fig 4.8.a) en el modelo celular HCT116. Sin embargo, no hemos podido detectar niveles de expresión de los receptores c-Kit (fig 4.8.b), a pesar de estar descrito (Attoub et al., 2002), ni de otros receptores como EGFR (fig 4.8.c), en este modelo celular.

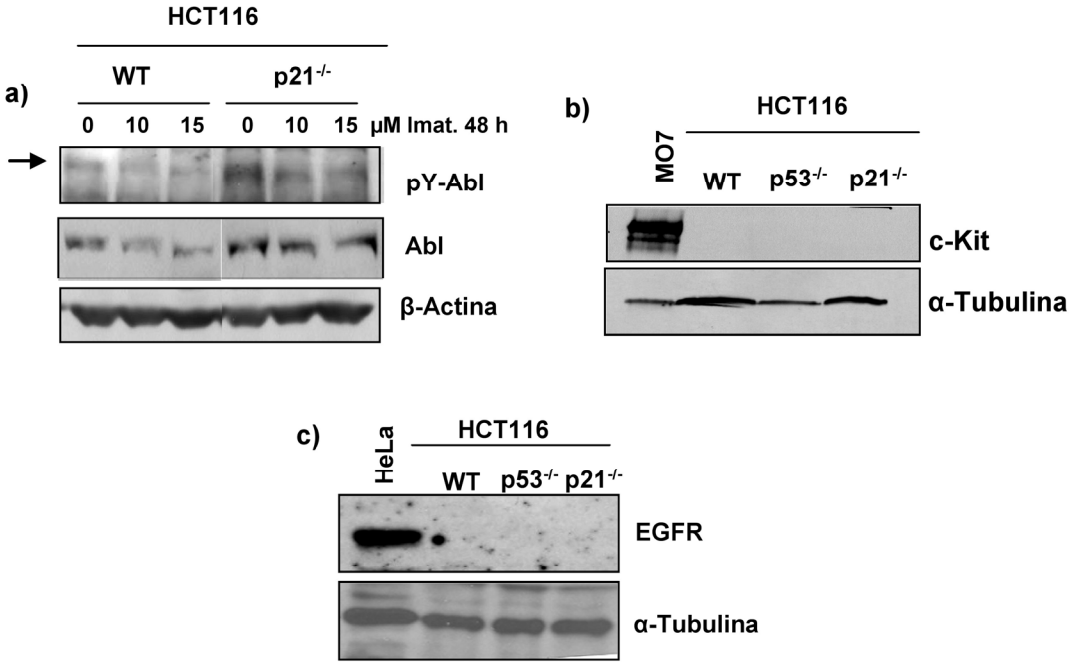


Fig 4.8 Estudio de las dianas terapéuticas de imatinib. a) Células HCT116 (WT y p21$^{-/-}$) tratadas a dosis crecientes de imatinib durante 48 h. Estudio de los niveles de expresión de ABL y de fosforilación de ABL mediante western blot con anticuerpos anti- ABL y anti-p-Tyr. Como control de carga se utilizó anti-β-Actina. b) Estudio de los niveles de expresión de c-Kit en las líneas celulares HCT116 mediante western blot. Control positivo de la línea celular MO7 que expresan c-Kit. Como control de carga se utilizó anti α-Tubulina. c) Estudio de los niveles de expresión de EGFR en las líneas celulares HCT116 mediante western blot. Control positivo de expresión de EGFR la línea celular HeLa. Como control de carga se utilizó α-Tubulina.

Con este resultado, decidimos realizar una búsqueda de otras quinasas que pudieran estar alteradas en presencia de imatinib. Estudiamos la actividad de quinasas que están involucradas en diferentes procesos: AKT (PKB), participa en rutas anti-apoptóticas al fosforilar e inactivar componentes de la maquinaria apoptótica (Martelli et al., 2006); ERK, está relacionada con procesos de supervivencia celular (Fabregat et al., 2007) y también estudiamos la fosforilación de la quinasa c-SRC relacionada con procesos anti-apoptóticos (revisado en Stephanou and Latchman, 2005). Estudiamos la activación mediante western blot y anticuerpos fosfo-específicos. Observamos que las tres proteínas estaban hiper-activadas en HCT116p21$^{-/-}$ respecto a HCT116WT sin tratamiento (calle "C" de la figura 4.9). Además, en células HCT116p21$^{-/-}$ se produce una disminución de la actividad quinasa SRC relacionada con procesos anti-apoptóticos a altas dosis de imatinib. Sin embargo, en células HCT116WT la forma activada de las quinasas aumenta a dosis creciente de imatinib (fig 4.9). Lo más notable de estos resultados, es el alto grado de activación de ERK, AKT y c-SRC que presentan las células mutadas para p21 en condiciones basales.

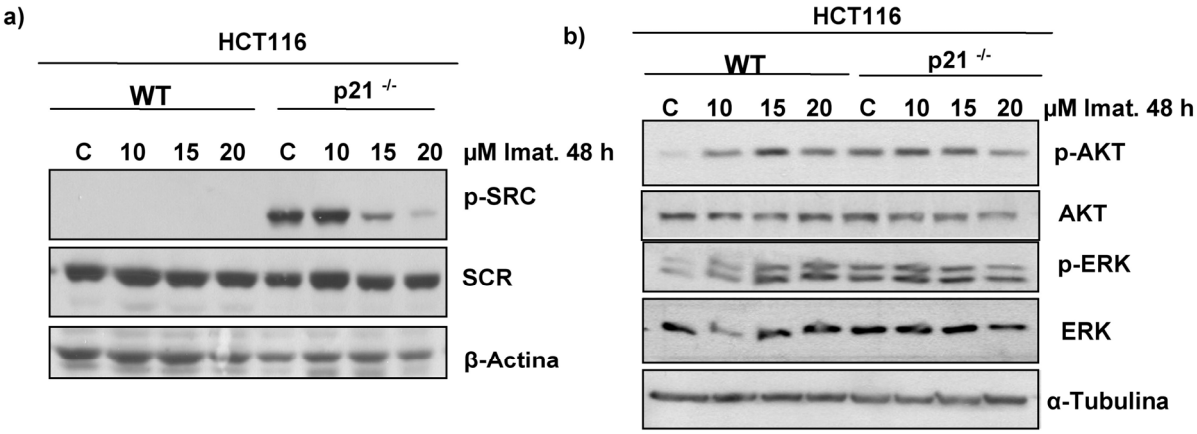


Fig 4.9 HCT116 p21$^{-/-}$ presenta una elevada actividad quinasa respecto a HCT116 WT. Las células HCT116 (WT y p21$^{-/-}$) fueron tratadas con dosis crecientes de imatinib durante 48 h. Las actividades quinasas se detectaron mediante el estudio de los niveles de fosforilación con anticuerpos anti-p-quinasas. a) Estudio de los niveles de fosforilación de SRC. b) Estudios de los niveles de fosforilación de AKT y ERK. Como control de carga se usó la β-Actina y la α-Tubulina.

4.1.2 Modulación de p21 y su efecto sobre la apoptosis mediada por imatinib.

Los resultados anteriores indicaban una característica de HCT116p21$^{-/-}$ no descrita hasta ahora, y que hacía necesario investigar si los efectos apoptóticos que observábamos eran o no debidos a la ausencia p21. Para ello realizamos tres abordajes

complementarios: reducir los niveles de p21 mediante Myc o siRNA en células HCT116WT y recuperar los niveles de p21 con un sistema inducible en células HCT116p21$^{-/-}$.

4.1.2.1 Represión de p21 inducida por la sobre-expresión de Myc

Seoane y Massague (Seoane et al., 2002), describieron que el aumento de expresión de Myc en células de cáncer colorectal HCT116, aumentaba ligeramente la apoptosis por fármacos genotóxicos (ADR), debido a la represión transcripcional que ejercía Myc sobre el promotor de p21. En estas condiciones p21 actuaba como un protector de la apoptosis inducida por ADR.

En este trabajo, quisimos determinar si estos resultados se reproducían con fármacos no genotóxicos como imatinib. Para contestar a esta pregunta en primer lugar analizamos si imatinib inducía cambios en la expresión de c-Myc endógeno. Tal y como se muestra en la figura 4.10, imatinib no induce cambios significativos en la expresión de Myc en ninguna de las tres líneas celulares HCT116, a pesar de la parada proliferativa (HCT116WT y HCT116p53$^{-/-}$) o apoptosis (HCT116p21$^{-/-}$) que produce.

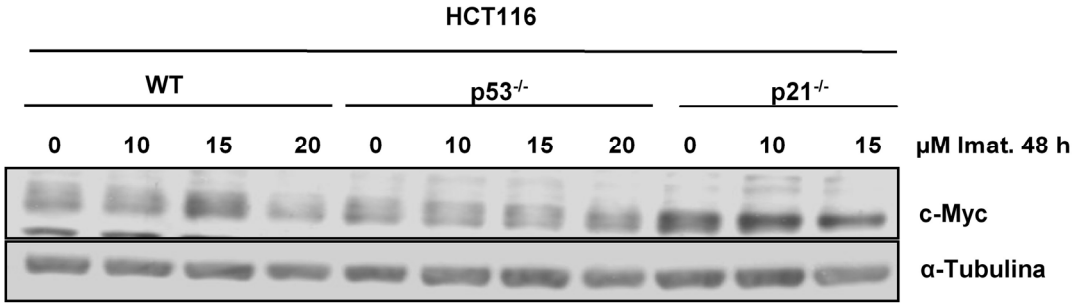


Fig 4.10 Imatinib no induce cambios en la expresión de c-Myc. Estudio de los niveles de expresión de c-Myc endógeno en las líneas celulares HCT116 (WT, p53$^{-/-}$ y p21$^{-/-}$) a dosis crecientes de imatinib durante 48 h. El estudio se realizó mediante western blot. Como control de carga se utilizó la α-Tubulina.

4.1.2.1.1 Obtención de transfectantes estables con expresión condicional de Myc en HCT116.

Generamos sublíneas de HCT116 con expresión inducible de Myc, utilizando retrovirus pBabepuroMyc-ER. La proteína de fusión MycER^{TM}, es el resultado de la fusión del factor de transcripción Myc con el dominio de unión al ligando del receptor de

estrógenos, este último con una mutación que le hace específico para el 4 hidroxi-tamoxifeno (4OHT). De esta forma, en ausencia de ligando, MycER se encuentra anclada a chaperonas (Hsp90) en el citoplasma y es inactivo. Tras la unión del ligando (4OHT) al dominio receptor de estrógenos, la proteína de fusión entra en el núcleo y se une a secuencias dianas de Myc ejerciendo su función (Littlewood et al., 1995) (fig 4.11.a). Las tres líneas celulares de cáncer colorectal (WT, p53$^{-/-}$ y p21$^{-/-}$) se infectaron con los retrovirus y se seleccionaron en un medio con puromicina, obteniéndose un "pool" de cada sublínea celular con expresión inducible de MycER^{TM}. Además, se obtuvieron líneas control con el vector vacío pBabepuro.

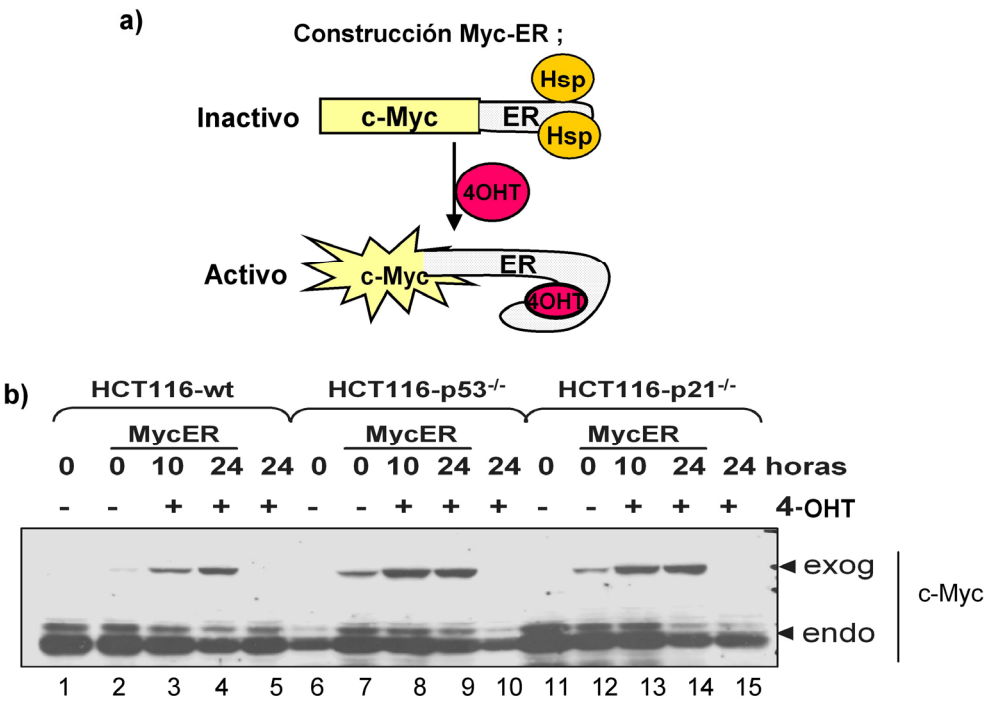


Fig 4.11 Análisis de las sublíneas HCT116Myc-ER. a) Esquema de la construcción retroviral de la proteína de fusión MycER. En ausencia del ligando (4OHT) la proteína se encuentra inactiva. Cuando el ligando está presente se une al dominio receptor de estrógenos y la proteína c-Myc se activa. b) Las diferentes sublíneas HCT116MycER se infectaron con el vector retroviral pBABE-MycER. Cada sublínea fue tratada (+) con 100 nM de 4OHT durante 10 y 24 h, como se indica. La expresión de c-Myc exógeno y endógeno se analizo mediante western blot con anticuerpos anti-Myc.

La figura 4.11.b muestra el análisis por western blot de las tres líneas obtenidas, donde se observa la presencia de la proteína de fusión MycER (aproximadamente de 100 kDa). La adición de 4OHT a cultivos de células HCT116Myc-ER produce una clara

disminución de la proteína Myc endógena en un tiempo de 24 h (fig 4.11.b, comparar carriles 4, 9 y 14 con 2, 7 y 12). Esto es debido a un fenómeno ya descrito de auto-supresión de Myc endógeno por el exógeno, y nos sirve para corroborar la funcionalidad del Myc ectópico. La infección de HCT116 con pBabeMyc-ER, inhibe la inducción de la proteína p21 (fig 4.12), como se esperaba en presencia de adriamicina. La inhibición en la expresión de p21 por Myc, es debido a que Myc actúa como un represor de la expresión de p21 (ver Introducción, 1.2.3), ello también sirvió para corroborar la funcio nalidad del Myc ectópico.

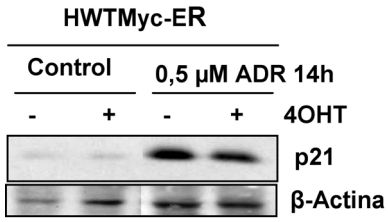


Fig 4.12 Myc induce una disminución de la expresión de la proteína p21. Se estudio la expresión de p21 mediante western blot en las células HCT116WTMyc-ER tratadas y sin tratar con 100 nM 4OHT y con 0,5 μM de ADR. Como control de carga se utiliza la β-Actina.

4.1.2.1.2 Efecto de la expresión ectópica Myc sobre la apoptosis inducida por imatinib.

Una vez obtenidas las sublíneas celulares HCT116Myc-ER y comprobada la represión de p21, quisimos estudiar si el aumento de expresión de Myc modificaba el efecto inductor de apoptosis por imatinib en células parentales. Para ello, primero analizamos los cambios de expresión de la proteína Myc a dosis crecientes por western blot. Observamos que los niveles de expresión de Myc endógeno e exógeno no variaban significativamente con dosis creciente de imatinib en las tres líneas celulares (fig 4.13).

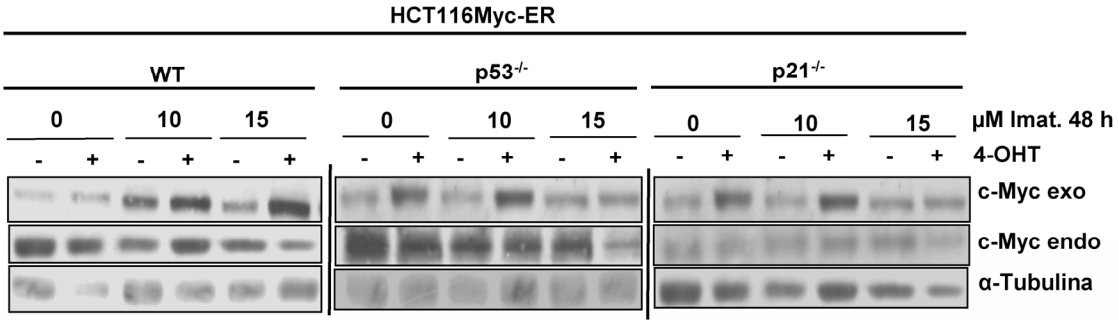


Fig 4.13 Imatinib no induce cambios de expresión de Myc. Se estudió la expresión de c-Myc mediante western blot, en células HCT116 Myc-ER tratadas (+) y sin tratar (-) con 100 nM 4-OHT y con dosis crecientes de imatinib durante 48 h. Como control de carga se utiliza α-Tubulina.

Se observa una estabilización de Myc exógeno en respuesta a 4OHT, efecto ya observado en otros modelos y cuyo mecanismo no está claro. Sin embargo, lo más interesante era determinar si el aumento de expresión de Myc variaba los efectos de imatinib en el modelo celular HCT116. Para ello, en primer lugar comprobamos que Myc no inducía apoptosis en condiciones basales en la línea parental (fig 4.14). Analizamos la rotura de la proteína PARP como marcador de apoptosis (fig 4.14.a). Observamos, que el aumento de expresión de Myc en HCT116WT, p53$^{-/-}$ ó p21$^{-/-}$ no modifica los resultados obtenidos en las correspondientes líneas sin expresión ectópica de Myc, es decir, sólo en la línea HCT116p21$^{-/-}$ en presencia de imatinib se inducía la rot ura de PARP.

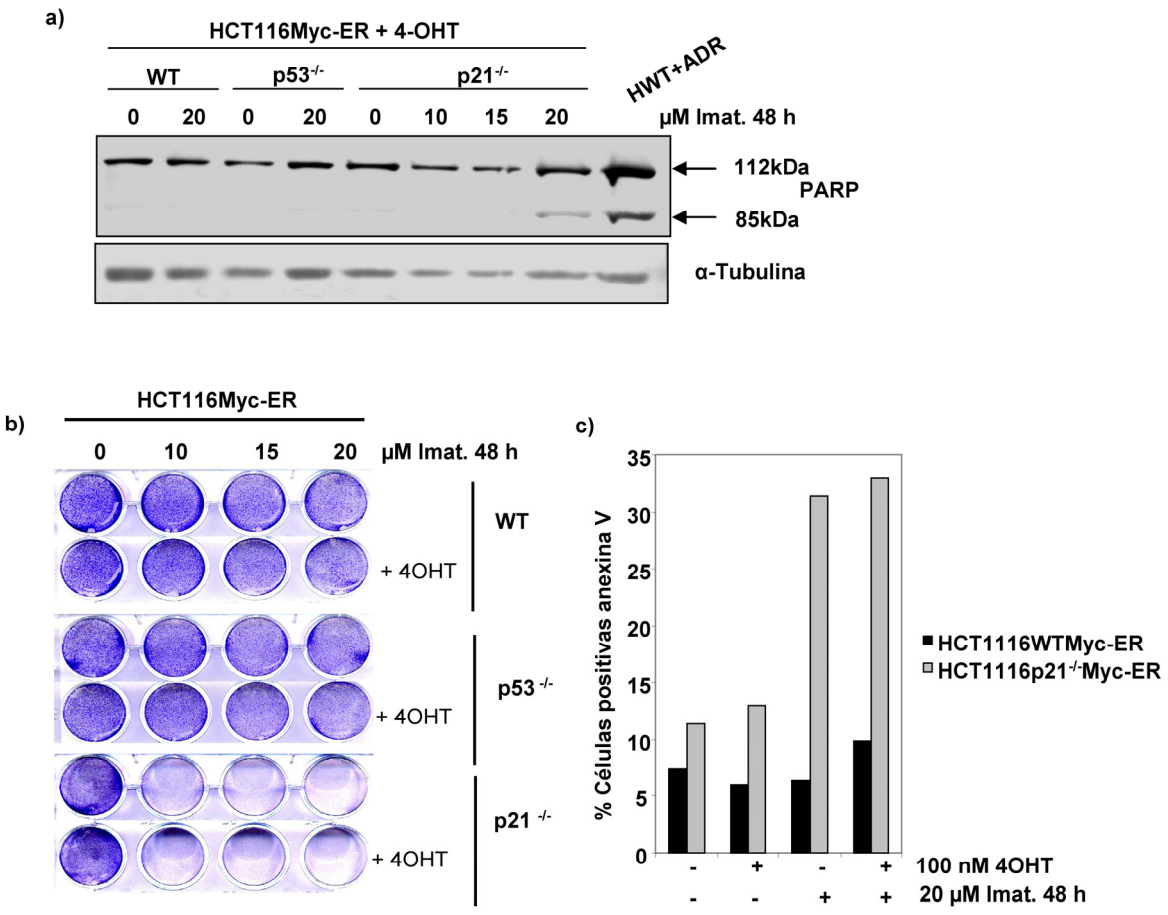


Fig 4.14 La expresión ectópica de Myc no modifica la apoptosis por imatinib en HCT116. Las células HCT116Myc-ER fueron tratadas con 100 nM 4OHT y con dosis crecientes de imatinib durante 48 h. a) Análisis de la rotura proteolítica de PARP mediante western blot. La rotura proteolítica de PARP genera dos fragmentos, 112 kDa y 85 kDa. El control positivo de la rotura de PARP son células HCT116WT tratadas con 0,5 µM ADR durante 48 h. Como control de carga se utiliza α-Tubulina. b) Ensayos clonogénicos a dosis crecientes de imatinib en ausencia y presencia (+ 4OHT) de Myc exógeno. Las células se tiñeron con 1 % de cristal violeta. c) Porcentaje de población anexina V obtenido mediante citometría de flujo.

Este mismo resultado también lo observamos con experimentos de proliferación (fig 4.14.b). Las células HCT116p21$^{-/-}$Myc-ER en presencia de imatinib son las únicas que sufren apoptosis y esta no es modificada por la expresión ectópica de Myc. Sin embargo, HCT116WTMyc-ER (que conlleva una represión de los niveles de p21) o HCT116p53$^{-/-}$ Myc-ER no presentan mayor sensibilidad a imatinib. Además, el estudio de unión a anexina V en células HCT116 WT y HCT116p21$^{-/-}$ no demostró un aumento significativo del porcentaje de células anexina-positiva con expresión ectópica de Myc respecto a la expresión de Myc endógeno (Fig 4.14.c). Por lo tanto, el aumento de expresión de Myc no induce apoptosis en HCT116WT o en HCT116p53$^{-/-}$, ni tampoco rescata este efecto en la línea HCT116p21$^{-/-}$.

En resumen, este resultado sugería que quizá la ausencia de p21 en las células HCT116p21$^{-/-}$ no era responsable de la apoptosis inducida por imatinib, a diferencia de lo que había sido observado en este modelo celular con sobre-expresión de Myc en presencia de fármacos genotóxicos, (Seoane et al., 2002). Para confirmarlo, generamos otros sistemas donde la expresión condicional de p21 en HCT116p21$^{-/-}$ o un silenciamiento parcial de p21 mediante RNA de interferencia (shp21) en HCT116WT, nos ayudara a esclarecer el papel de p21 en los efectos de inhibidores tirosina-quinasa.

4.1.2.2 Expresión ectópica condicional de p21

Un segundo abordaje para determinar si la ausencia de p21 era la responsable del fenotipo hipersensible de las células HCT116p21$^{-/-}$, fue obtener una sublínea derivada de HCT116p21$^{-/-}$ con expresión ectópica inducible de p21 y ensayar el papel protector de p21 frente a fármacos no genotóxicos. Para ello, usamos el vector pMTCB6-p21 que dirige la expresión del cDNA de p21 humano mediante el promotor de la metalotioneína, que es inducible por Zn^{2+} (Andrews, 2000). En nuestro laboratorio, ya se ha utilizado este vector de expresión en células K562 con p21 (Canelles et al., 1997; Delgado et al., 1995; Munoz-Alonso et al., 2005).

4.1.2.2.1 Obtención de transfectantes estables con expresión condicional de p21 en HCT116p21$^{-/-}$.

Las células HCT116p21$^{-/-}$ se co-transfectaron con los vectores de expresión pMTCB6-p21 y pLPCX, (este último permitió seleccionar los cultivos con puromicina, ver Materiales y Métodos 3.3.1). Se obtuvieron colonias puntuales que fueron aisladas y expandidas, hasta obtener alrededor de 30 clones y se seleccionaron aquellos que presentaba expresión ectópica e inducible de p21 en respuesta a $ZnSO_4$. Escogimos el

clon Nº 17 como positivo y recibió el nombre de HKO-MTp21-17 (fig 4.15). Como control de la inducción de p21 construimos otra sublínea con el vector vacío de pMTCB6, denominada HKO-MT. Si comparamos la inducción de p21 de esta sublínea control con la sublínea HKO-MTp21-17, podremos observar que no existe expresión de p21 en la línea control que procede de las células HCT116p21$^{-/-}$, lo que implica que los cambios en los niveles de p21 no se deben a efectos no deseados del tratamiento con Zn^{2+}.

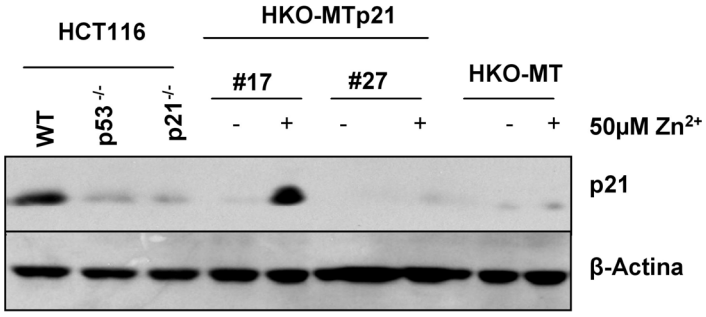


Fig 4.15 Análisis de los clones con p21 inducible. Los diferentes clones derivados de HCT116 p21$^{-/-}$ transfectados con el vector de expresión pMT-CB6-p21 (HKO-MTp21) y con el vector vacío pMT-CB6+(HKO-MT) se trataron con (+) y sin (-) 50 μM $ZnSO_4$ tal como se indica. La expresión de p21 se analizó mediante western blot. Como control de carga se utiliza la β-Actina.

En cuanto a la cinética de inducción de p21 (fig 4.16), la proteína comienza a observarse a las 3 horas de inducción con Zn^{2+} y su expresión va en aumento con el tiempo, presentando un máximo a las 12 horas de inducción. A partir de este tiempo (12 h), los niveles de expresión de la proteína p21 retornan paulatinamente a sus niveles básales y a los 5 días la inducción de la expresión de p21 es casi inexistente. En ausencia de Zn^{2+}, se observa una ligera expresión de p21 en la línea HKO-MTp21 que se atribuye a la fuga de expresión por parte del vector pMTCB6-p21.

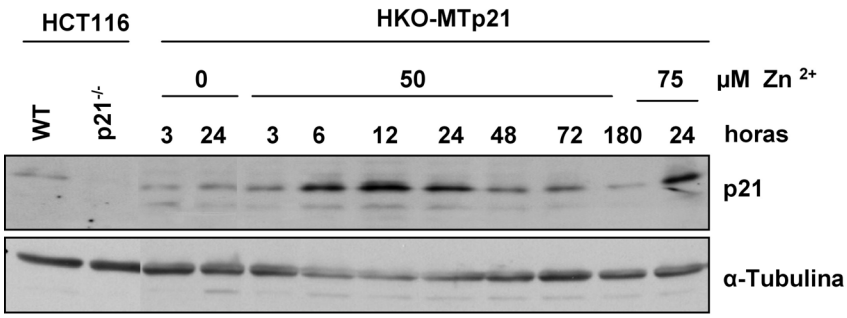


Fig 4.16 Cinética de inducción de p21 en HKO-MTp21. Las células HKO-MTp21 se cultivaron en presencia de 50 y 75 μM ZnSO4 durante los tiempos indicados. Los niveles de p21 se analizaron mediante western blot con anticuerpo anti-p21. Como control de carga se analizó la α-Tubulina.

En la figura 4.16, también puede observarse que la expresión de p21 con 75 µM $ZnSO_4$ es mayor que con 50 µM $ZnSO_4$ en el mismo tiempo, lo que indica que la regulación de la expresión de p21 es dosis-dependiente.

Debido a la importancia de la localización subcelular de p21 para sus efectos biológicos (ver Introducción 1.5.2.2), se analizó la ubicación de p21 en las células HKO-MTp21 mediante inmunofluorescencia. La figura 4.17 muestra que la localización de la proteína p21 inducida es fundamentalmente nuclear, siendo esta localización la descrita y esperable para esta proteína.

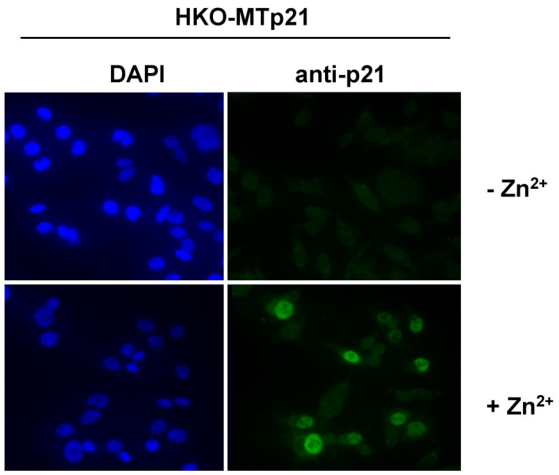


Fig 4.17 Localización celular de p21 en la línea celular HKO-MTp21. Imágenes de microscopía de fluorescencia donde se muestra células HKO-MTp21 incubadas en ausencia o en presencia de 50 µM $ZnSO_4$ durante 12 h, y posteriormente incubadas con anticuerpo contra p21 (paneles de la derecha) o teñidos los núcleos celulares con DAPI (paneles de la izquierda).

4.1.2.2.2 Efecto de la expresión ectópica de p21 sobre la apoptosis inducida por imatinib.

Para determinar si la ausencia de p21 era responsable del fenotipo hipersensible de las HCT116p21$^{-/-}$ a imatinib, se realizaron experimentos de viabilidad celular en la sublínea HKO-MTp21. En la figura 4.18.a podemos observar mediante micrografías de contrastes de fases que la muerte inducida por imatinib es similar en presencia y ausencia de p21. Mediante citometría de flujo se analizó el porcentaje de células anexina positivas (4.18.b). Los resultados obtenidos no demostraron diferencias significativas con la expresión ectópica de p21 en presencia de imatinib. Además, se analizó la viabilidad

celular por ensayos de WST-1 (fig 4.18.c). De nuevo, se confirmaron los datos obtenidos anteriormente y la expresión ectópica de p21 no modificaba significativamente la viabilidad (como medida de actividad metabólica) en presencia de imatinib.

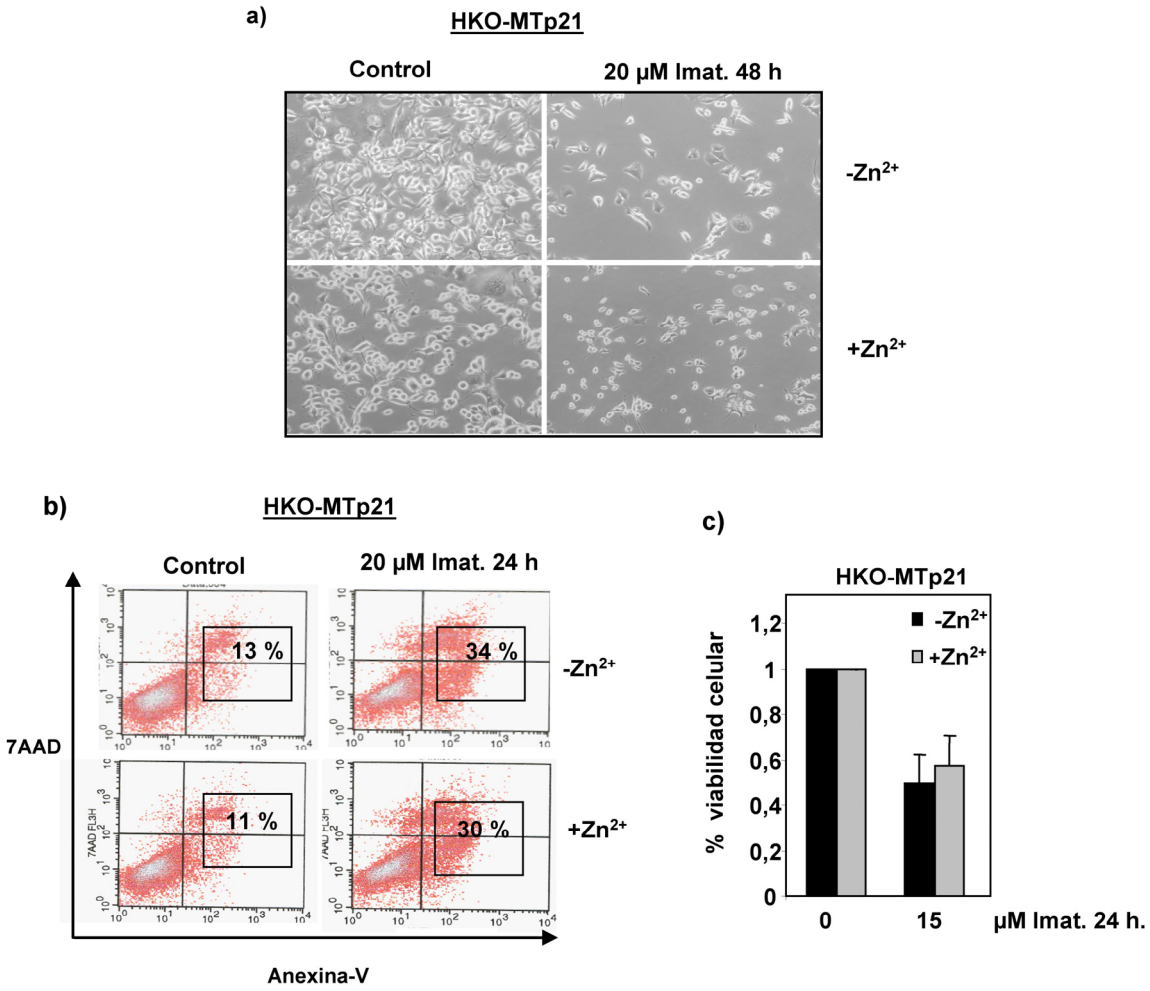


Fig 4.18 La expresión ectópica de p21 no modifica la sensibilidad de la línea célular HKO-MTp21 a imatinib. Las células HKO-MTp21 inducidas (+) o no inducidas (-) con 50 µM $ZnSO_4$ se trataron con imatinib. a) Fotografías de contraste de fases de células HKO-MTp21 con ($+Zn^{2+}$) y sin ($-Zn^{2+}$) inducción de p21, tratadas o no con 20 µM imatinib durante 48 h. b) Ensayos de anexina V representados en histogramas; los porcentajes de apoptosis de cada línea celular se representan en el interior del histograma. Las células se trataron con imatinib durante 24 h. c) Ensayos de reducción de la sal de tetrazolio WST-1. Las células HKO-MTp21 se trataron con 15 µM imatinib en células con ($+Zn^{2+}$) y sin ($-Zn^{2+}$) expresión ectópica de p21. Las barras representan el promedio ± SEM (n=3).

En conjunto estos resultados confirmaban que la deficiencia de p21 en las células HCT116p21$^{-/-}$ no parece ser responsable de la sensibilidad observada a fármacos inhibidores de quinasas.

4.1.2.3 Silenciamiento de la expresión de p21

Un tercer abordaje para elucidar si p21 protegía de la apoptosis causada por inhibidores tirosina-quinasa, fue a través de la inhibición de la expresión de p21, mediante RNA de interferencia. Nuestro objetivo era determinar si el silenciamiento de la expresión de p21 en el modelo celular HCT116WT incrementaría la sensibilidad a fármacos, de manera similar a lo observado en el modelo celular HCT116p21$^{-/-}$.

4.1.2.3.1 Obtención de transfectantes estables con shp21 en la línea celular HCT116.

Las células HCT116WT se infectaron con retrovirus shp21. Estos virus se obtuvieron transfectando a las células empaquetadoras Phoenix A con el plásmido pRetroSuper-p21. En paralelo se infectó el plásmido control pRetroSuper a las células HCT116WT, creando de este modo la sublínea HCT-pRS (fig 4.19.a).

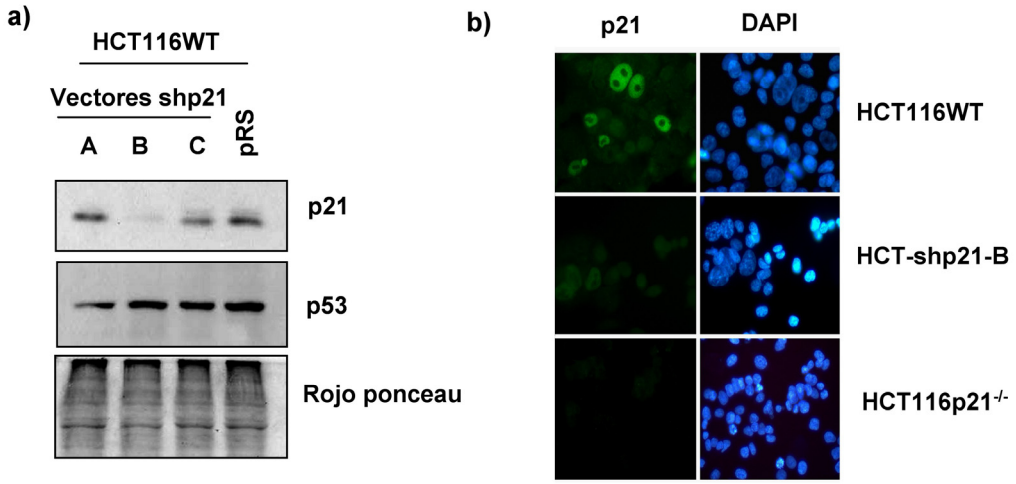


Fig 4.19 Análisis de la sublínea HCT-shp21. a) Análisis de las infecciones con los diferentes RNA de interferencia de p21 (A, B, C) y con el vector pRetroSuper (pRS), mediante western blot con anticuerpos anti-p21. Como control de carga se tiñó el filtro de nitrocelulosa con rojo ponceau, poniendo de manifiesto las proteínas totales transferidas desde el gel. b) Imágenes de microscopía de fluorescencia donde se muestran las células HCT116WT (panel superior), las células con silenciamiento de p21(HCT-shp21-B) (panel central) y las células HCT116 p21$^{-/-}$ (panel inferior). Las diferentes líneas celulares fueron incubadas con anticuerpo anti-p21 (paneles de la izquierda) o teñidos los núcleos celulares con DAPI (paneles de la derecha).

En un principio, se obtuvieron tres sublíneas infectadas con distintos vectores shp21 (A, B, C), pero tan solo la infectada con el vector B denominada HCT-shp21-B, mostraba un silenciamiento notable de la expresión de p21 respecto a la infectada con el vector vacío (fig 4.19.a). El silenciamiento de p21 se corroboró mediante inmunofluorescencia (fig 4.19.b). Se puede observar como la expresión de p21 en la sublínea HCT-shp21-B era muy inferior a la de la línea HCT116WT y similar al marcaje de fondo observado para HCT116p21$^{-/-}$.

4.1.2.3.2 Efecto de la supresión de p21 sobre la apoptosis inducida por imatinib

Como ya se ha indicado anteriormente (apartado 4.1.2.1.2 y 4.1.2.2.2), necesitábamos corroborar el papel de p21 en la apoptosis inducida por imatinib. Para ello analizamos la muerte celular en la línea donde habíamos silenciado p21 (HCT-shp21). En la figura 4.20.a podemos observar que dosis crecientes de imatinib tan solo indujeron apoptosis en la línea mutada para p21 (HCT116p21$^{-/-}$) y no en la línea HCT-shp21. Además, realizamos estudios de unión anexina V (fig 4.20.b), encontrando de nuevo el mayor porcentaje de población anexina positiva en las células HCT116p21$^{-/-}$, mientras que las células HCT-shp21 se comportan como las células parentales.

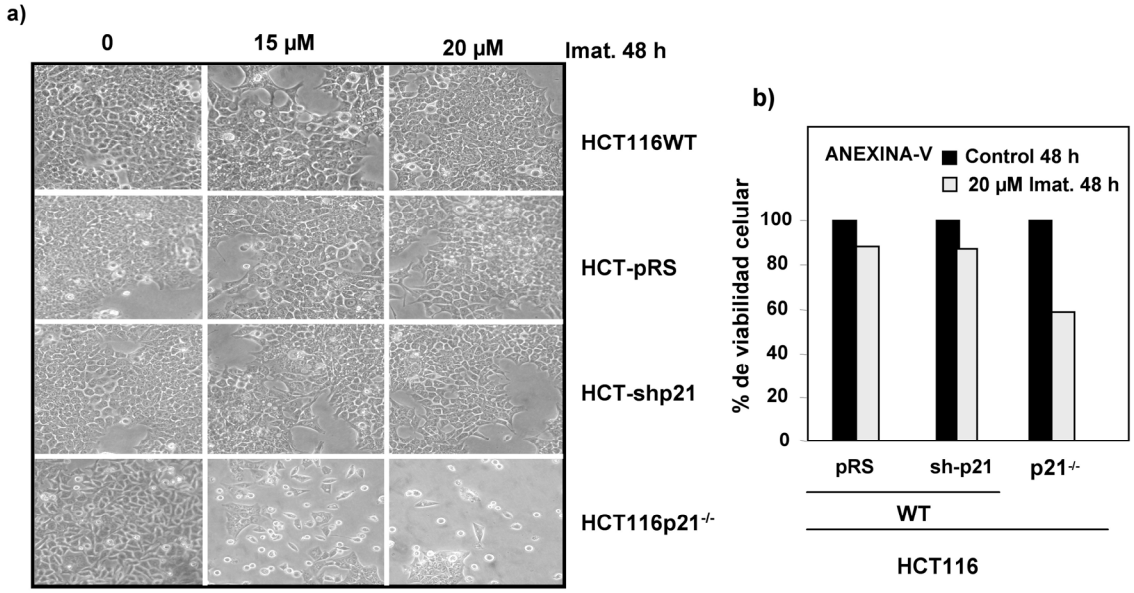


Fig 4.20 La supresión de p21 no afecta a la apoptosis inducida por imatinib. a) Micrografiás de las líneas celulares HCT116 (WT, pRS, sh-p21 y p21$^{-/-}$) tratadas con 15 y 20 µM de imatinib durante 48 h. b) Estudio de población anexina V mediante citometría de flujo. El porcentaje de viabilidad celular se representa en el diagrama de columnas y se corresponde con células anexina V negativas. Se muestra un experimento representativo de tres realizados.

La figura 4.21 muestra ensayos clonogénicos realizados en las líneas con modificaciones en la expresión de p21 (HCT-shp21 y HKO-MTp21) y en las líneas parentales HCT116WT y HCT116p21$^{-/-}$ respectivamente. Estos ensayos realizaron en presencia de fármacos genotóxicos como ADR y 5-FU e inhibidores tirosina-quinasa como imatinib y gefitinb. Una vez más, la expresión ectópica de p21 (HMTKO-p21) o el silenciamiento parcial de p21 (HCT-shp21), no modificaron la sensibilidad a fármacos genotóxicos (ADR y 5-FU), ni a inhibidores tirosina-quinasa (imatinib y gefitinb), respecto a sus líneas parentales (HCT116p21$^{-/-}$ y HCT116WT).

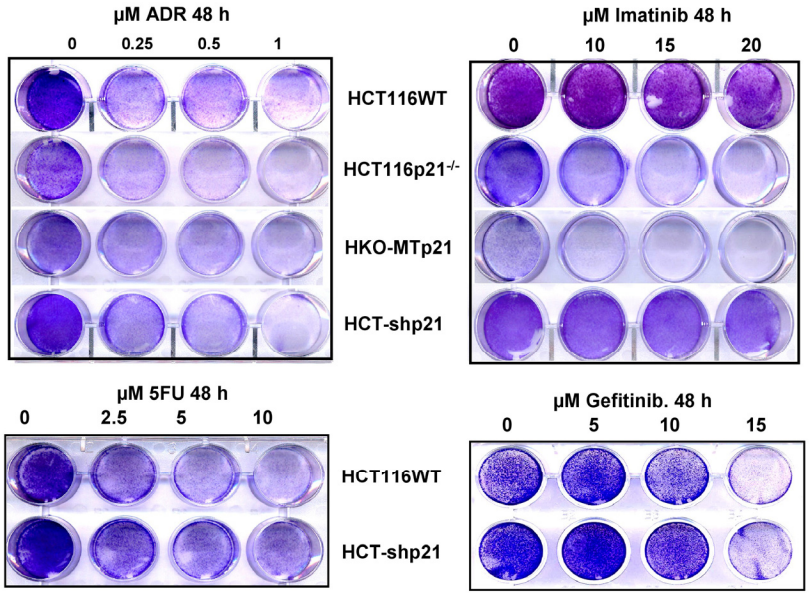


Fig 4.21 La expresión ectópica de p21 (HKO-MTp21) o el silenciamiento de p21 (HCT-shp21), no modifican la sensibilidad a fármacos genotóxicos (ADR y 5-FU), ni a inhibidores tirosin-quinasa (imatinib y gefitinb). Ensayos clonogénicos realizados en las líneas celulares HCT116 (WT, p21$^{-/-}$, shp21 y KO-MTp21) a dosis crecientes de fármacos durante 48 h. Posteriormente, las células se tiñieron con 1 % de cristal violeta.

En resumen, mediante tres aproximaciones experimentales diferentes hemos observado los mismos resultados. Concluímos, que la deficiencia de p21 no es responsable de la respuesta citotóxica y pro-apoptótica de la línea celular HCT116p21$^{-/-}$ frente a fármacos genotóxicos ni inhibidores de tirosina-quinasa.

4.1.3 Expresión diferencial de genes entre HCT116 y HCT116p21$^{-/-}$ en presencia y en ausencia de imatinib.

Como consecuencia de los resultados anteriores, y para tratar de dilucidar el por qué del aumento de sensibilidad de las células HCT116p21$^{-/-}$ a imatinib o gefitinib, estudiamos la expresión realizamos de un genes anti-apoptótico como Bcl-2 y otro gen inductor de la apoptosis como Bax (fig 4.22). En el estudio de expresión de Bax, no hallamos diferencias significativas entre la línea celular HCT116WT y la línea HCT116p21$^{-/-}$ en presencia o ausencia de imatinib. Sin embargo, observamos una ligera disminución de la expresión de proteína anti-apoptótica Bcl-2 en la línea mutada para p21, que no era modificada tras el tratamiento con imatinib.

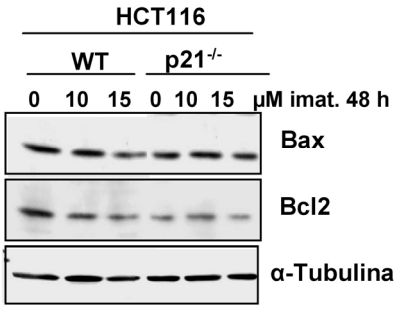


Fig 4.22 Imatinib no induce cambios de expresión de Bax y Bcl-2. Western blot realizado con anticuerpos contra Bax y Bcl-2 en lisados de células HCT116 (WT y p21$^{-/-}$) tratadas con 10 y 15 µM de imatinib durante 48 h. Como control de carga se utilizó α-Tubulina.

Para ampliar el estudio de expresión de genes de apoptosis, decidimos hibridar macroarrays con cDNAS de células HCT116WT y HCT116p21$^{-/-}$ sin tratar y tratadas con 15 µM de imatinib (dosis a la que se observa apoptosis temprana). Se usó un "GeArray^{TM} Q Series Human Apoptosis Gene Array". Con este GeArray pudimos determinar la expresión de 96 genes involucrados en la regulación y en la mediación de la apoptosis o programa de muerte celular (fig 4.23). En los macroarrays de las células tratadas con imatinib, se distinguen cambios mayores de expresión de genes apoptóticos en la línea celular HCT116p21$^{-/-}$ que en la línea parental, donde apenas se aprecian cambios de expresión por imatinib (fig 4.23.a).

En resumen, nos encontramos con una alta proporción de genes efectores de apoptosis que aumentaban su expresión con imatinib en la línea celular HCT116p21$^{-/-}$ (tabla 4.1).

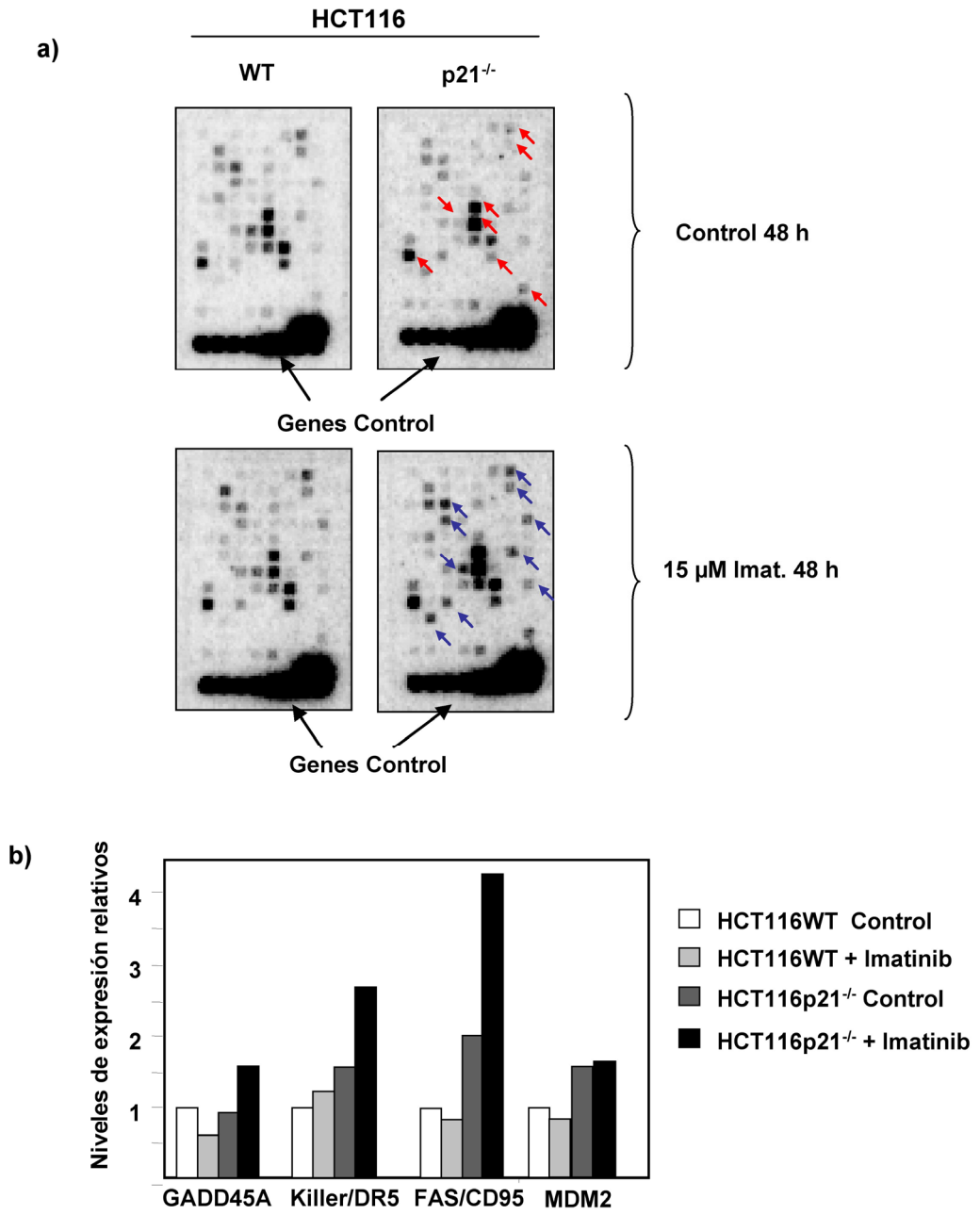


Fig 4.23 Análisis por macroarray de genes de apoptosis. a) Macroarrays hibridados con cDNAS de células HCT116WT y HCT116p21$^{-/-}$ sin tratar y tratadas con 15 µM de imatinib durante 48 h. Con flechas azules se muestran genes que cambian su expresión en el macrroarray hibridado con cDNA de células HCT116p21$^{-/-}$ en presencia de imatinib, respecto a los mismos spots en el macroarray hibridado con cDNA de células HCT116p21$^{-/-}$ no tratadas. Con flechas rojas se muestran genes que cambian su expresión en el macroarray de células HCT116p21$^{-/-}$ no tratadas respecto a los mismos spots en el macroarray de células HCT116WT no tratadas. Los genes control aparecen en la parte inferior de cada membrana hibridada. b) Cuantificación de la señal obtenida en los macroarrays hibridados. En el histograma de columnas, se representan los niveles de expresión de algunos genes diana de p53 en células HCT116 (WT y p21$^{-/-}$) en presencia y ausencia de imatinib. Los niveles de expresión de cada gen se normalizan con la señal obtenida de los genes control de cada macroarray, tal y como se describe en Materiales y Métodos (3.1.6). El valor de una unidad corresponde a la expresión de los genes en las células parentales (HCT116WT).

GEN	HCT116 WT	HCT116 p21$^{-/-}$	Ontología
MCL1	1,2	2,7	BCL-2
BAX	0,8	1,6	BCL-2
HRK	0,9	2	BCL-2
BIML	1	2,2	BCL-2
FADD	0,8	1,5	BCL-2
BNIP3	1	3,13	BCL-2
BFAR	1,05	1,6	EMC
APAF1	1	1,5	CARD
CARD4	0,9	1,7	CARD
BCL10	1,4	2,3	CARD
BIRC2	0,75	3	IAP
BIRC3	1	1,9	IAP
BICR4	1	1,9	IAP
BICR5	0,8	2,53	IAP
BICR6	0,5	2,7	IAP
CASP7	1,2	2,2	Caspasas
CASP8	0,5	2,5	Caspasas
CASP14	0,8	2,21	Caspasas
CASP2	0,7	1,8	Caspasas
CASP3	0,9	1,8	Caspasas
CASP6	1,2	1,6	Caspasas
CIDEA	0,8	1,9	CIDE
DFFA	1	1,8	CIDE
DFFB	0,8	1,9	CIDE
GADD45A	0,6	1,7	p53
HUS1	1,05	2,3	p53
CHEK1	0,8	2,3	p53
RPA3	0,6	2,1	P53
CKAP4	1	1,8	p53
CHK2	0,5	1,8	p53
MYD88	1	1,53	DMC
RIPK2	0,7	1,9	DMC
CFLAR	1	2	DMC
4-1BB	1,2	2,5	R-TNF
LTBR	1	1,8	R-TNF
KILLER/DR5	0,8	1,7	R-TNF
FAS/CD95	0,8	2,1	R-TNF
DR3/Apo3	1	2	R-TNF
TNFRSF14	0,9	2,3	R-TNF
TNFR1	1	2,5	R-TNF
LTA	1	2	R-TNF
ºTRAIL-R/DR4	1,1	1,7	L-TNF
TRAIL	1,2	1,7	L-TNF
TRAIL-R4/DCR2	1	2,3	L-TNF
HVEML	1,2	1,7	L-TNF
TANK/TRAF-1	0,9	3	TRAF
TRAF3	1,5	1,6	TRAF
TRAF4	1,2	1,6	TRAF

Tabla 4.1 Genes Modificados en respuesta a Imatinib. Análisis estadístico obtenido tras la normalización con los estándares internos (β-Actina y GAPDH). Los datos de expresión de cada gen se expresa con respecto a su expresión en células sin tratar. Un valor de uno indica que el imatinib no induce diferencias de expresión del gen correspondiente. Los colores agrupan a cada familia: EMC (familia de efectores de muerte celular). DMC (familia con dominio de muerte celular), L-TNF (familia de ligandos TNF), R-TNF (familia de receptores TNF).

El aumento de expresión de genes reguladores de la apoptosis, está en concordancia con la apoptosis inducida por imatinib en el modelo celular HCT116p21$^{-/-}$.

Otro dato relevante es que muchos de estos genes reguladores de apoptosis, ya mostraban un aumento de expresión en la línea celular HCT116p21$^{-/-}$ sin tratamiento alguno, comparándolo con la línea celular HCT116WT (fig 4.24.a, flechas rojas). Algunos de estos genes eran dianas transcripcionales del factor de transcripción p53 y participan como efectores apoptóticos (Killer/DR5 y Fas/CD95) (fig 4.23.b). Sin embargo, no hallamos diferencias significativas en otros genes pro-apoptóticos como BAX y genes activados en situación de estrés celular como GADD45A. Además, otro de los genes diana de p53 que demostró mayor expresión en la línea mutada para p21 fue el regulador de p53, MDM2. En todos los casos, exceptuando MDM2, los genes diana de p53 aumentaron claramente su expresión en presencia de imatinib en células HCT116p21$^{-/-}$ pero no en células parentales (fig 4.23.b). Todos estos resultados, nos sugieren que la apoptosis observada en ausencia de p21 está relacionada con los niveles de expresión de p53.

4.1.4. Expresión, actividad y modificaciones postraduccionales del factor de transcripción p53 en el modelo celular HCT116p21$^{-/-}$.

4.1.4.1 Expresión y actividad de p53 en HCT116p21$^{-/-}$.

Dado que en HCT116p21$^{-/-}$ se inducían genes diana de p53, se pasó a investigar el posible papel de p53 en la línea mutada para p21 y su implicación en la respuesta a inhibidores tirosina-quinasa. Para ello, se analizó en primer lugar la expresión de la proteína p53 en células HCT116WT y HCT116p21$^{-/-}$ en presencia y ausencia de imatinib (fig 4.24).

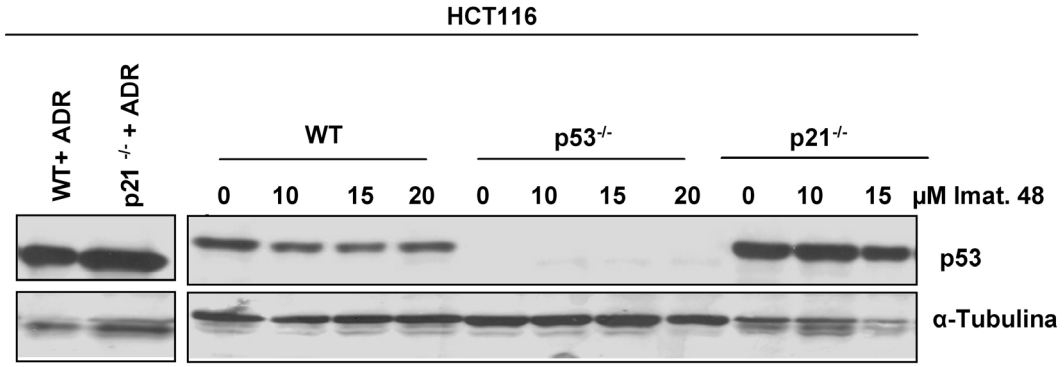


Fig 4.24 La línea deleccionada en p21 presenta mayores niveles de expresión de p53. Estudio de los niveles de expresión de p53 mediante western blot. El estudio se realiza en líneas celulares HCT116 (WT, p53$^{-/-}$ y p21$^{-/-}$) tratadas con dosis crecientes de imatinib durante 48 h. Como control de la expresión de p53 se trataron las líneas HCT116WT y HCT116p21 $^{-/-}$ con 1 μM ADR durante 24. Como control de carga se analiza la α-Tubulina.

En este estudio, pudimos observar mayores niveles de expresión de p53 en la línea HCT116p21$^{-/-}$respecto a la línea parental, aunque estos niveles variaban poco en presencia de imatinib.

Por otra parte, también estudiamos la expresión de los miembros de la familia Cip/Kip como son p21 (fig 4.25.a), p27 y p57 (fig 4.25.b). En estos resultados, podemos observar que no existen cambios de expresión con imatinib, en ninguno de los inhibidores Cdk. Sin embargo en condiciones basales, la línea mutada para p21 y la línea mutada para p53 presentaban un aumento de expresión de p27 y p57 respecto a la línea parental (fig 4.25.b). Este hecho podría explicarse por un efecto compensatorio entre los miembros de la familia Cip.

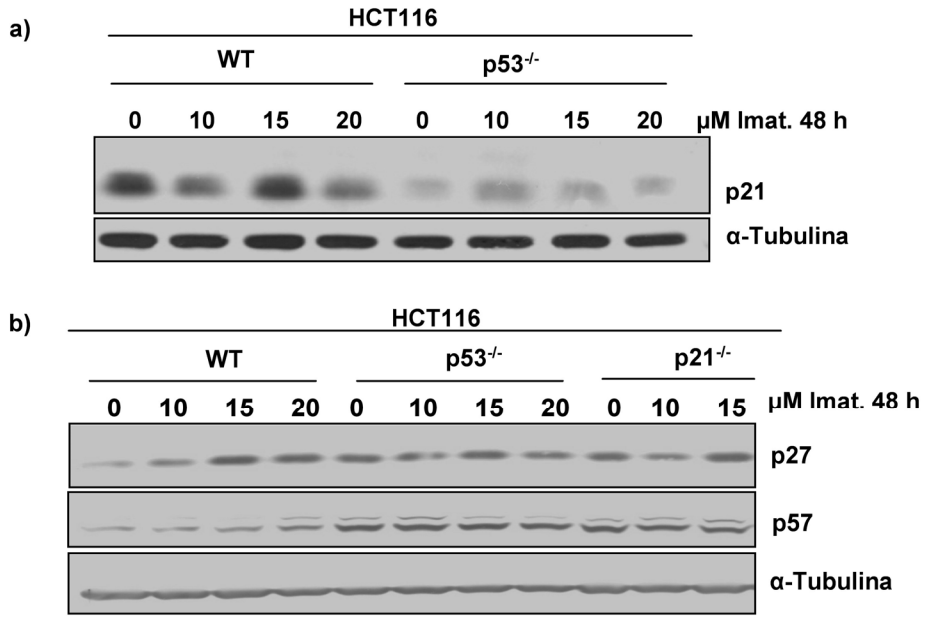


Fig 4.25 Imatinib no induce cambios de expresión de p21, p27 y p57. a) Western blot realizado con anticuerpos anti-p21en lisados de células HCT116 (WT y p21$^{-/-}$) tratadas con dosis creciente de imatinib durante 48 h. b) Western blot realizado con anticuerpos contra p27 y p57 en lisados de células HCT116 (WT, p53$^{-/-}$ y p21$^{-/-}$) tratas con dosis creciente de imatinib durante 48 h. Como control de carga se utiliza α-Tubulina.

4.1.4.2. Estabilidad y modificaciones postraduccionales de p53.

El hecho de que encontráramos un incremento de expresión de la proteína p53 en la línea HCT116p21$^{-/-}$, nos condujo a estudiar si esa sobre-expresión de p53 se correspondía con un aumento de su actividad. Para ello, realizamos ensayos luciferasa

con promotores de algunos de sus genes diana acoplados al gen de la luciferasa (p21-Luc, MDM2-Luc y PG13-Luc un promotor sintético consistente en 13 lugares de unión para p53) (fig 4.26).

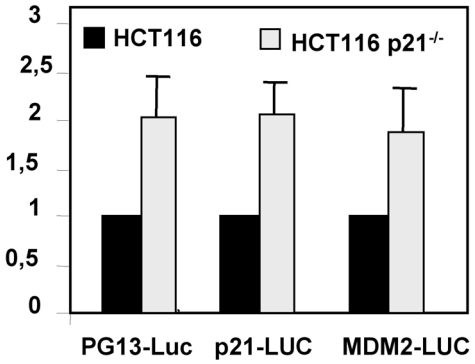


Fig 4.26 La línea celular HCT116 p21$^{-/-}$ tiene mayor actividad transactivadora de p53 que la línea celular HCT116 WT. Las líneas celulares HCT116 (WT y p21$^{-/-}$) fueron transfectadas con los promotores PG13-Luc, p21-Luc y MDM2-Luc. Tras 36 horas de transfección, se realizaron los ensayos luciferasa. Las barras representan el promedio ± SEM (n=3) de la actividad luciferasa de cada promotor normalizado con la actividad del gen de la luciferasa de Renilla, asignando a la actividad de las células HCT116 WT el valor de la unidad.

Los resultados obtenidos demostraron, que p53 presentaba una mayor actividad transactivadora en la línea HCT116p21$^{-/-}$. Decidimos comprobar si este aumento de expresión y de actividad de p53, estaba relacionado con un aumento de la estabilidad de la proteína. Para ello, se trataron a las células con cicloheximida (un inhibidor de la síntesis proteica) a distintos tiempos (fig 4.27). Los niveles de p53 se analizaron por western blot. El resultado obtenido, demostró que la vida media de la proteína p53 era mayor en las células mutadas para p21.

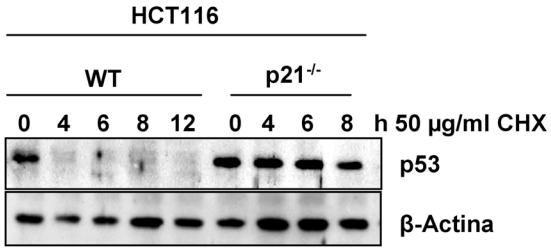


Fig 4.27 La proteína p53 tiene mayor estabilidad en la línea celular HCT116 p21$^{-/-}$ respecto a la línea HCT116 WT. Las células HCT116 (WT y p21$^{-/-}$) fueron tratadas con cicloheximida (CHX). Los niveles de p53 se analizaron mediante western blot con anticuerpos contra p53. Como control de carga se analizó la β-Actina.

Existen una numerosas modificaciones postraduccionales que regulan la estabilidad y la actividad de p53 (ver 1.6.2). En este trabajo, hemos realizado un estudio sobre algunas de las fosforilaciones descritas que participan en la estabilidad y actividad

de p53 (Ser 6, 9, 15, 20, 37, 46 y 392) (fig 4.28). Mediante western blot, comprobamos que las células HCT116p21$^{-/-}$ (pero no las células parentales) presentaban fosforilaciones en la Ser 9, 15 y 392 de p53. Las fosforilaciones de la Ser9 (mediada por la quinasa CKI) y de la Ser15 (mediada por las quinasas ATM y ATR) tienen lugar en respuesta a daño celular. La fosforilación en la Ser392 (mediada por la quinasa Ck2) regula la oligomerización de p53 y determina la especificidad en la unión a DNA.

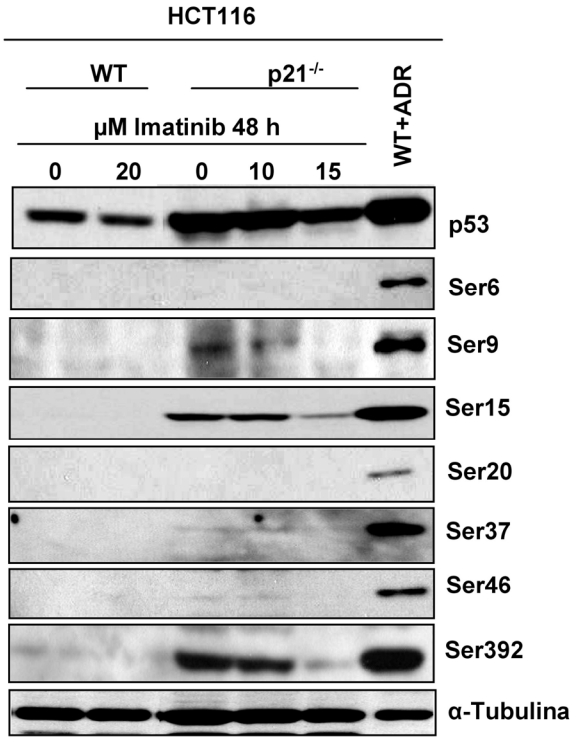


Fig 4.28 La línea mutada en p21 presenta modificaciones postraduccionales en p53 que le permiten aumentar su estabilidad. Análisis de western blot con anticuerpos anti-pSer6, 9, 15, 20, 37, 46 y 392. El estudio de las fosforilaciones en p53 se realiza en líneas HCT116 (WT y p21$^{-/-}$) tratadas con dosis crecientes de imatinib durante 48 h. Como control de las distintas fosforilaciones en p53 se analiza la expresión de cada una de estas serinas en la línea celular HCT116 WT tratada con 0,5 µM de ADR durante 48 h. Como control de carga se analiza la α-Tubulina.

Las modificaciones postraduccionales halladas explicaban el aumento de expresión, estabilidad y actividad transactivadora de p53. Está descrito por algunos autores que la fosforilación en la Ser15 en su dominio amino terminal, impiden que p53 se una con su más inmediato regulador MDM2, de este modo aumenta la estabilidad de la proteína p53 (ver Introducción 1.3.2). Ello explicaría porqué tenemos niveles de expresión tan elevados de p53. Sin embargo, MDM2 es a su vez, una diana transcripcional de p53 y un aumento de expresión de p53, implica un aumento de expresión de MDM2. Por lo tanto se realizó un estudio de los niveles de expresión de la proteína MDM2 (fig 4.29), y hallamos niveles altos de expresión en condiciones basales en células HCT116p21$^{-/-}$ respecto a células parentales.

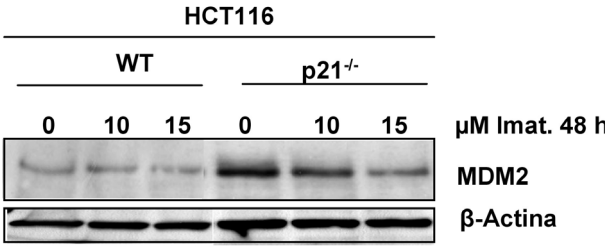


Fig 4.29 La línea celular HCT116 p21$^{-/-}$ presenta altos niveles de expresión de MDM2. Análisis de los niveles de expresión de MDM2 en las líneas celulares HCT116 (WT y p21$^{-/-}$) tratadas a dosis crecientes de imatinib durante 48 h. El estudio de expresión de MDM2 se realiza mediante western blot. Como control de carga se analiza la β-Actina.

En resumen, las células HCT116p21$^{-/-}$ presentaban en condiciones basales una proteína p53 más estable que se correlacionaba con el aumento de expresión y de actividad transcripcional observado.

4.1.4.3 Efecto de la modulación de p21 sobre la expresión de p53.

El aumento de expresión de p53, nos llevó a pensar que quizás la delección de p21 podría ser responsable indirecto del aumento de expresión, estabilidad y actividad de p53. Para verificar esta hipótesis, se estudió los niveles de expresión de p53 y/o de fosforilación de la Ser15 y Ser392 en las diferentes sublíneas creadas con modificación de la expresión de p21: 1) la sublínea HKO-MTp21, previamente descrita (fig 4.30.a), con expresión ectópica de p21 inducible por Zn^{2+}, 2) la sublínea HCT-shp21, previamente descrita (fig 4.30.b), con reducción de la expresión de p21 mediante RNA de interferencia, 3) la sublínea HKOAd-p21 (fig 4.30.c). Esta tercera línea celular fue obtenida infectando las células HCT116WT con adenovirus de la proteína p21 fusionada con GFP (Ad-p21-GFP) (ver Materiales y Métodos 3.3.2). En paralelo, se obtuvo la sublínea celular control HKOAd-GFP infectada con adenovirus GFP (fig 4.30.c). Los resultados demostraron que las modificaciones en la expresión de p21, no eran los responsables del aumento de expresión y fosforilación de p53 observado en la línea parental HCT116p21$^{-/-}$.

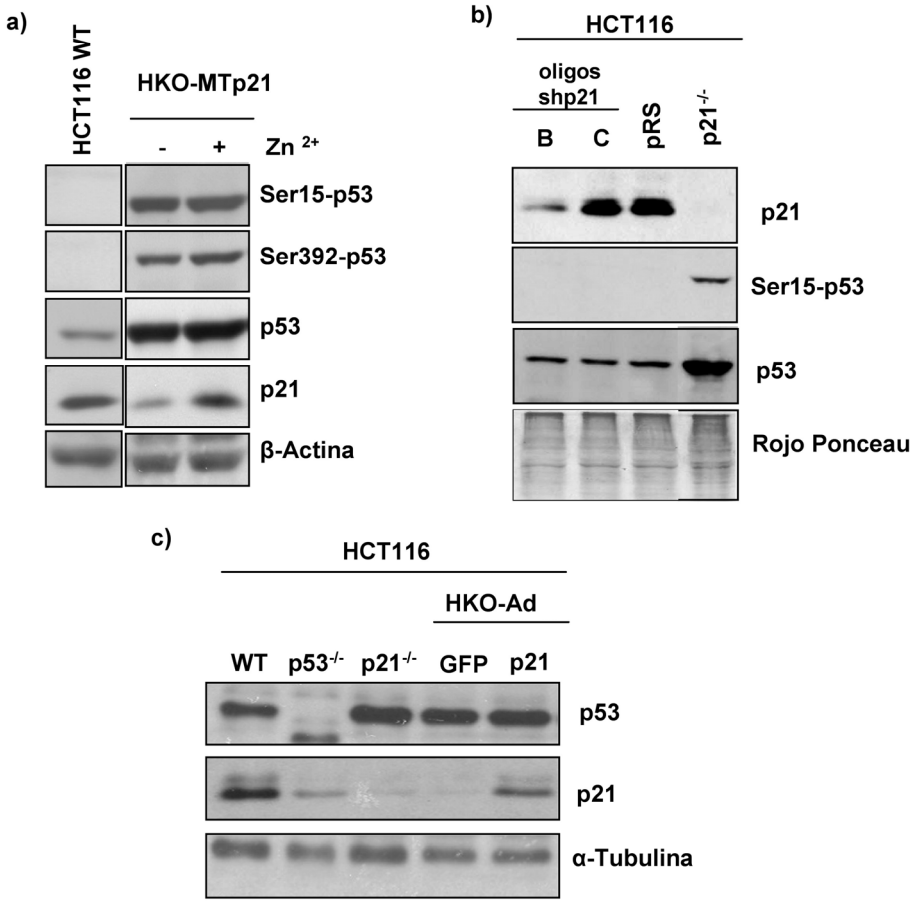


Fig 4.30 Los cambios de expresión de p21 no son responsables del aumento de expresión y de fosforilación de p53 en la línea celular HCT116 p21$^{-/-}$. Estudio de la expresión de p53, p21 y de las fosforilaciones Ser15 y Ser392 de p53, mediante western blot. a) Estudio de las proteínas mencionadas en la sublínea celular HKO-MTp21 con (+ Zn^{2+}) y sin (-Zn^{2+}) expresión ectópica de p21. Como control de carga se analiza la β-Actina. b) Análisis de p21, Ser15-p53 y p53 en la sublínea HCT-shp21. Como control de carga se tiñe el filtro con rojo ponceau. c) Análisis de p53 y p21 en la sublínea HKO-Adp21. Esta sublínea se obtuvo tras la infectar la línea celular HCT116p21$^{-/-}$ con adenovirus. Como control de carga se analizó la expresión de α-Tubulina.

TP53 es un gen frecuentemente mutado en el dominio de unión a DNA. Los resultados obtenidos hasta ese momento, indicaban que quizá la elevada expresión y actividad de p53 pudieran ser consecuencia de mutaciones en p53 en la línea HCT116p21$^{-/-}$. Por lo tanto, secuenciamos los exones del 2 al 11 del cDNA del gen TP53, tanto de la línea celular HCT116WT, como de la línea celular HCT116p21$^{-/-}$. En ningún

caso, hallamos ninguna mutación descrita hasta el momento en bases de datos de p53 (por ejemplo, http://iarc.fr/p53).

En resumen, el modelo celular HCT116p21$^{-/-}$ presenta mayor expresión y actividad del factor transcripcional p53, debido a las modificaciones postraduccionales de la proteína. Estas modificaciones y el aumento de expresión de p53 son independientes de los niveles de expresión de p21. Además, el modelo celular HCT116p21$^{-/-}$ posee mayor expresión de la proteína con actividad ubiquitin-ligasa, MDM2. Estos resultados, nos sugirieron que p53 y no p21, era responsable de la hipersensibilización observada a HCT116p21$^{-/-}$. Además, para confirmar si los resultados obtenidos eran debidos exclusivamente a las propiedades del modelo celular HCT116p21$^{-/-}$, repetimos el estudio de expresión de p53 en otras dos líneas celulares HCT116p21$^{-/-}$ procedentes de dos laboratorios distintos al nuestro (N. Agell, laboratorio de biología celular, Universidad de Barcelona y P.Dotto, Cutaneous Biology Cancer Research, MGH, Boston). En ambos casos se confirmaron nuestros resultados de hiper-sensibilidad y de mayor expresión de p53 (datos no mostrados).

Estos resultados, están en desacuerdo con muchos de los trabajos publicados que atribuyen a p21 un papel protector de apoptosis en el modelo celular HCT116p21$^{-/-}$ (ver Discusión 5.2).

4.1.5. Silenciamiento de la expresión de p53 en HCT116p21$^{-/-}$ y resistencia a fármacos.

A continuación, intentamos demostrar la hipótesis de que el factor de transcripción p53 era el responsable de la hipersensibilidad a fármacos observada en HCT116p21$^{-/-}$. Para ello, silenciamos p53 mediante RNA de interferencia o con una proteína dominante negativa.

4.1.5.1. Obtención de sublíneas con menor expresión de p53.

Generamos una sublínea que expresaba RNA de interferencia para p53 (fig 4.31.a) y otra sublínea con expresión ectópica del dominante negativo DDp53 (fig 4.31.b). La sublínea HCTKO-shp53 se obtuvo infectando las línea celular HCT116p21$^{-/-}$ con retrovirus pSR-shp53 y seleccionando con puromicina. En paralelo, se obtuvo la línea

control infectada con el vector pSR. En la figura 4.31.a, se observa que los niveles de expresión de p53 en HCTKO-shp53 son muy similares a los niveles de expresión en HCT116WT, e inferiores a los niveles de expresión en HCT116p21$^{-/-}$.

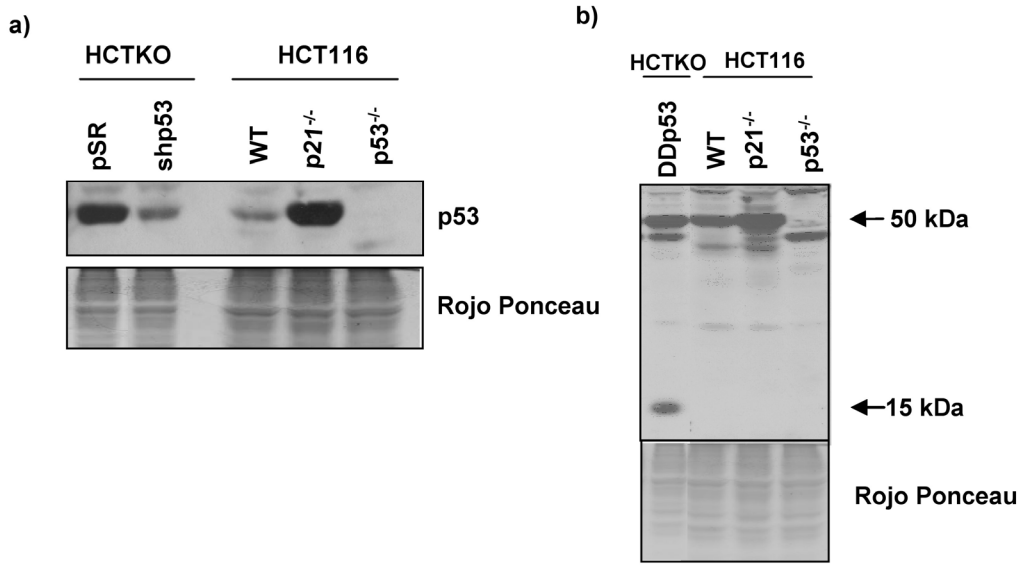


Fig 4.31. Análisis de sublíneas con silenciamiento en la expresión de p53. a) Análisis de la infección con RNA de interferencia-p53 en la línea celular HCT116p21$^{-/-}$. El estudio se realiza mediante western blot con anticuerpos anti-p53. b) Análisis de la sublínea DDp53 obtenida después de co-transfectar con los plásmidos pLPCX y pCDNA3-DDp53. El estudio se realiza mediante western blot con anticuerpo anti-p53. Se observan dos fragmentos; 50 kDa, tamaño de la proteína salvaje p53 y 15 kDa, tamaño de la proteína mutante dominante negativo DDp53. Como control de carga se tiñó el filtro de nitrocelulosa con rojo ponceau, poniendo de manifiesto las proteínas totales transferidas desde el gel.

La sublínea HCTKO-DDp53 se obtuvo co-transfectando pLPCX y pcDNA3-DDp53 (proporción 1:6) en la línea celular HCT116WT. La proteína DDp53 es una proteína dominante negativa de origen murino, compuesta por 100 aminoácidos que se corresponden con los primeros 13 codones de la proteína silvestre más los codones que abarcan desde el 302 al 390. Esta proteína se une al dominio N-terminal de la proteína silvestre e inactiva su función de unión específica a DNA y/o su activación transcripcional (Bowman et al., 1996). Una vez realizada la transfección obtuvimos 23 clones resistentes a puromicina. En paralelo, obtuvimos la línea celular con el vector vacío pcDNA3-pLPCX (HCTKO-Vector). Para confirmar la expresión de DDP53 realizamos westen blot y comparamos la expresión de p53 con las líneas HCT116WT, HCT116p53$^{-/-}$ y HCT116p21$^{-/-}$. Como se muestra en la figura 4.31.b la línea HCTKO-DDp53 (pool de los

clones 3-6-9), expresa el mutante dominante negativo DDp53 con un tamaño alrededor de 15 kDa. Además, HCTKO-DDp53 presenta una menor expresión de p53 respecto a la línea celular HCT116p21$^{-/-}$ y una expresión muy similar a HCT116WT.

4.1.5.2. Efecto de la supresión de p53 en HCT116p21$^{-/-}$ y resistencia a fármacos.

A continuación, analizamos la respuesta a imatinib y adriamicina en las dos líneas celulares generadas con una menor expresión de p53 (HCTKO-shp53 y HCTKO-DDp53), usando como control las líneas parentales HCT116p21$^{-/-}$ y HCT116WT. Como primera aproximación, realizamos estudios de microscopía de contrastes de fases (fig 4.32.a) y observamos que la disminución de expresión de p53 en ambos modelos celulares, confiere resistencia a imatinib. Para confirmar este dato, realizamos un estudio de apoptosis por el ensayo de unión de anexina V (fig 4.32.b).

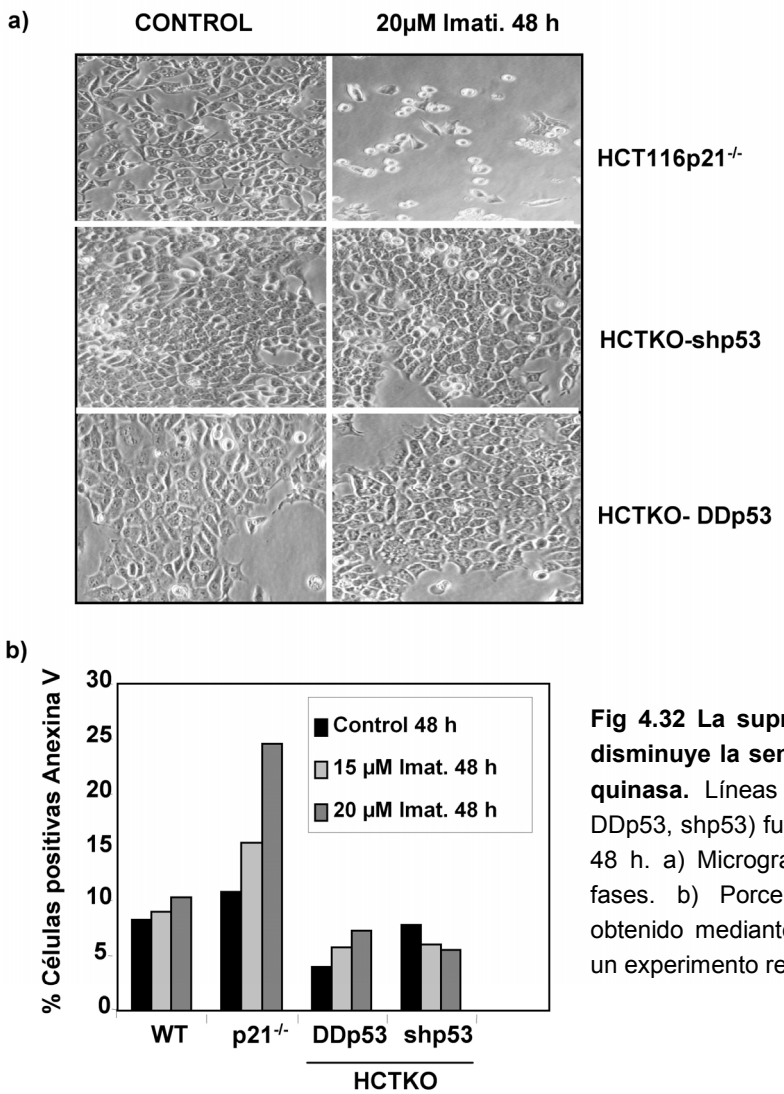


Fig 4.32 La supresión de p53 en HCT116 p21$^{-/-}$ disminuye la sensibilidad a inhibidores tirosina-quinasa. Líneas celulares HCT116 (WT, p21$^{-/-}$, DDp53, shp53) fueron tratadas con imatinib durante 48 h. a) Micrografías realizadas con contraste de fases. b) Porcentaje de población anexina V, obtenido mediante citometría de flujo. Se muestra un experimento representativo de tres realizados.

Los datos obtenidos mostraban que el silenciamiento de p53 o la expresión del mutante negativo de p53, confería a las células HCT116p21$^{-/-}$ un fenotipo de resistencia al imatinib, similar al observado en la línea parental HCT116WT.

Finalmente, quisimos confirmar si la reducción de la expresión de p53 también confería una disminución de la hipersensibilidad a fármacos genotóxicos. Para ello se realizaron ensayos clonogénicos en presencia de ADR (fig 4.33). Los resultados obtenidos, demostraron que el aumento de expresión de p53 era también responsable de la hiper-sensibilidad observada a adriamicina.

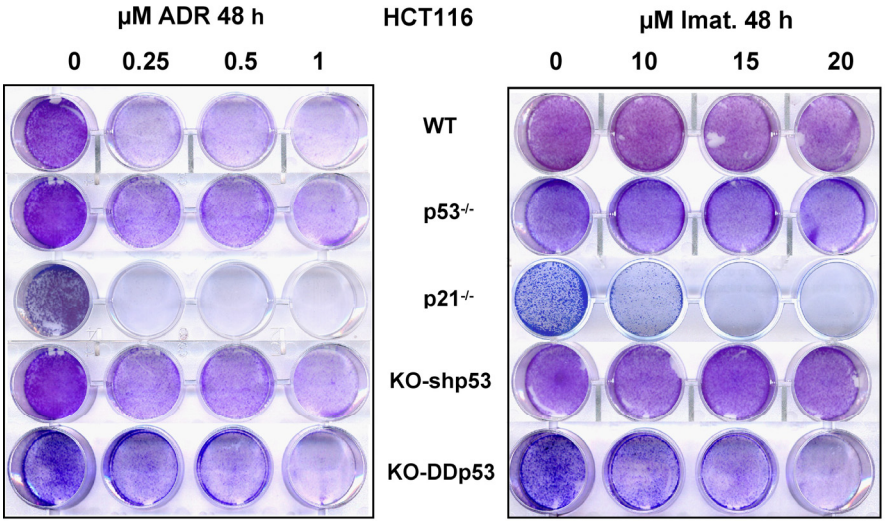


Fig 4.33 La supresión de p53 confiere resistencia a fármacos. Líneas celulares HCT116 (WT, p53$^{-/-}$, p21$^{-/-}$, KO-shp53, KO-DDp53) tratadas con adriamicina (ADR) o imatinib durante 48 h. Posteriormente se tiñieron con cristal violeta.

Estos resultados, confirman la hipótesis de que p53 era el responsable de la apoptosis observada en la línea celular HCT116p21$^{-/-}$ en presencia de inhibidores tirosina-quinasa y fármacos genotóxicos.

En resumen, observamos como la reducción de la expresión o de la activación de p53 en el modelo celular HCT116p21$^{-/-}$, nos permite obtener una línea celular con la misma sensibilidad que la línea parental HCT116WT. Efectivamente, está descrito que el mecanismo de apoptosis inducido por ADR es dependiente de p53. Un aumento de expresión de p53, aumenta la sensibilidad a fármacos genotóxicos. Por lo tanto, los resultados obtenidos consolidan este mecanismo y nos sugieren que imatinib podría también estar actuando vía dependiente de p53, aunque el efecto no sea tan dependiente de p53 como en el caso de adriamicina o otros fármacos genotóxicos. Para confirmar

esta hipótesis realizamos ensayos clonogénicos con altas dosis de imatinib en la línea parental y en la línea mutada para p53 (HCT116p53$^{-/-}$) (fig 4.34.a). El resultado obtenido demuestra que la ausencia de p53 confiere resistencia a imatinib. Además, el estudio de la población anexina V, demostró una mayor viabilidad celular en la línea HCT116p53$^{-/-}$ (fig 4.34.b).

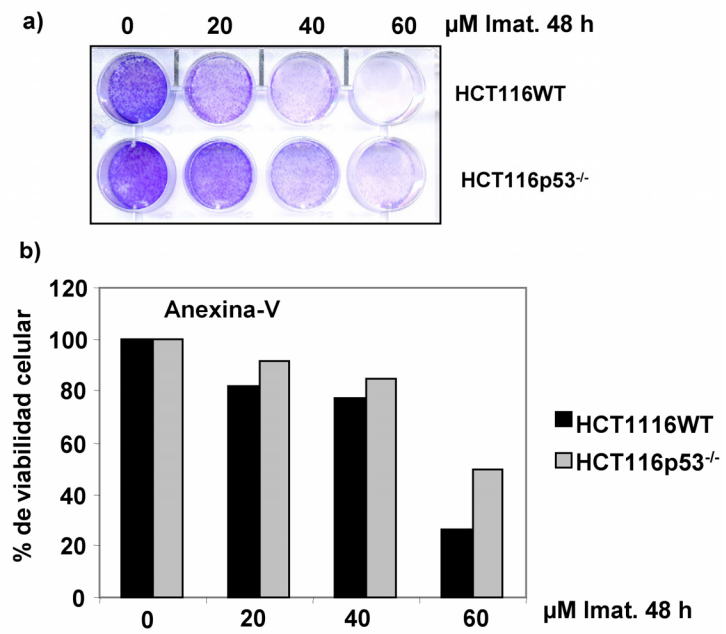


Fig 4.34 Imatinib actúa por un mecanismo dependiente de p53. Líneas celulares HCT116WT y HCT116p53$^{-/-}$ tratadas con altas dosis de imatinib durante 48 h. a) Ensayos clonogénicos a dosis crecientes de imatinib. Posteriormente se tiñieron con 1 % de cristal violeta. b) Estudio de población anexina V y 7-AAD mediante citometría de flujo. El porcentaje de viabilidad celular se representa en el diagrama de columnas y se corresponde con células anexina V negativas y 7-AAD negativas. Se muestra un experimento representativo de dos realizados.

A la vista de los resultados obtenidos se podría concluir: i) la ausencia de p21 no es responsable de la hipersensibilidad de la línea HCT116p21$^{-/-}$ a fármacos; ii) la línea HCT116p21$^{-/-}$, presenta un aumento de expresión y actividad de p53; iii) la sobre-expresión de p53 no es consecuencia de la ausencia de p21 en la línea celular HCT116p21$^{-/-}$; iv) el aumento de expresión y actividad de p53 en la línea HCT116p21$^{-/-}$ induce un aumento de sensibilidad a fármacos; v) imatinib induce apoptosis dependiente de p53.

Para finalizar el estudio del papel de p21 en respuesta a inhibidores tirosina-quinasa, exponemos a modo de resumen un esquema de los efectos observados en el modelo celular HCT116 en presencia de imatinib (fig 4.35).

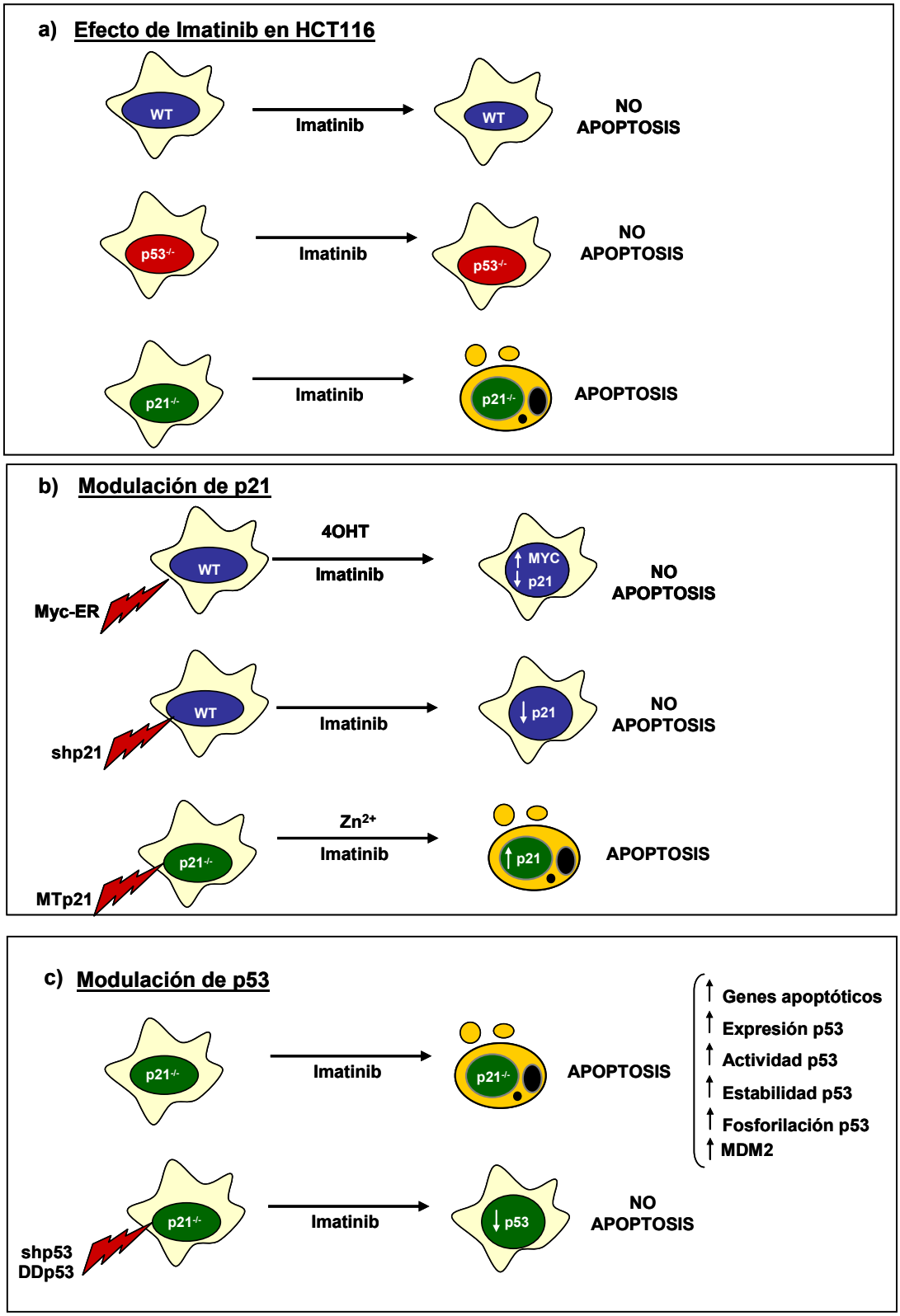


Fig 4.35 Esquema resumen del papel de p21 en respuesta a inhibidores tirosina-quinasa. a) Efecto de imatinib en HCT116 (líneas WT, p53$^{-/-}$ y p21$^{-/-}$), b) Efectos de la modulación de p21 (líneas HCT-MycER, HCT-shp21 y HKO-MTp21) en presencia de imatinib, c) Efectos de la modulación de p53 (líneas HCTKO-shp53 y HCTKO-DDp53) en presencia de imatinib.

4.1.6. Papel de p21 en la repuesta a imatinib en leucemia mieloide crónica.

Los resultados obtenidos en cáncer colorectal, demostraron apoptosis inducida por imatinib en un modelo celular con sobre-expresión de p53 (HCT116p21$^{-/-}$). Nuestro siguiente objetivo, fue analizar si estos efectos ocurrían en otro modelo celular que no expresase p53 y que fuese sensible al imatinib, como era K562, una línea celular derivada de leucemia mieloide crónica. Trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio, determinaron que imatinib induce parada proliferativa y una marcada apoptosis en el modelo celular K562 (Gomez-Casares et al., 2004). Estas células presentan la translocación cromosómica t(9;22) que da como resultado la aparición de la proteína tirosina-quinasa Bcr-Abl, principal diana terapéutica del imatinib.

En nuestro laboratorio, disponíamos de una sublínea celular (Kp21) con expresión ectópica de p21 (Munoz-Alonso et al., 2005). La expresión condicional del cDNA de p21 esta controlada mediante el promotor de la metalotioneína (pMTCB6-p21), por lo que la actividad de este promotor se estimula mediante la adición al medio de Zn^{2+} (Andrews, 2000), observándose el pico de máxima expresión de p21 entre las 3 y las 6 h de inducción (fig 4.36 a). Esta inducción se mantiene a un tiempo, observándose una caída progresiva en su expresión tras 48 h de inducción. Además, una de las ventajas del sistema de inducción mediante el promotor de la metalotioneína es que se puede modular el nivel de expresión mediante la adición de distintas cantidades de Zn^{2+} al medio de cultivo (fig 4.36.b).

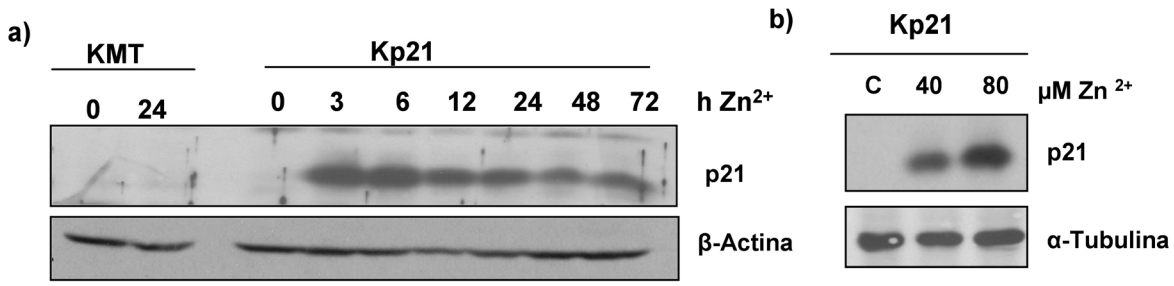


Fig 4.36 Cinética de inducción de p21 en la línea célular Kp21. a) Western blot realizado con anticuerpos contra p21 de lisados de células KMT (transfectadas con el vector vacío) y Kp21 tratadas y sin tratar a distintos tiempos con 75 μM $ZnSO_4$. Como control de carga se analiza la β-Actina. b) Western blot realizado con anticuerpos contra p21 de lisados de células Kp21 tratadas con distintas concentraciones de $ZnSO_4$ durante 8 h. Como control de carga se analiza la α-Tubulina.

Para analizar el efecto de imatinib en ausencia de p53 y con expresión inducible de p21 comparamos los efectos de imatinib en las líneas K562 y Kp21, analizando la rotura de PARP (fig 4.37.a). Los resultados obtenidos, demostraron la rotura de PARP en K562, pero no en Kp21 con expresión ectópica de p21. Por otra parte, realizamos estudios de citometría de flujo para determinar el porcentaje de células en la fase sub-G0 (fig 4.37.b) y el porcentaje de células anexina-positivas (fig 4.37.c). En ambos casos, obtuvimos una menor población de células anexina-positivas y de células en fase sub-G0 en el modelo celular Kp21. En contraste, el tratamiento de las células parentales K562 con $ZnSO_4$ no indujo ninguna resistencia a imatinib (dato no mostrado). Por consiguiente, los datos obtenidos confirmaban el papel protector de p21 en Kp21 respecto a las células parentales K562.

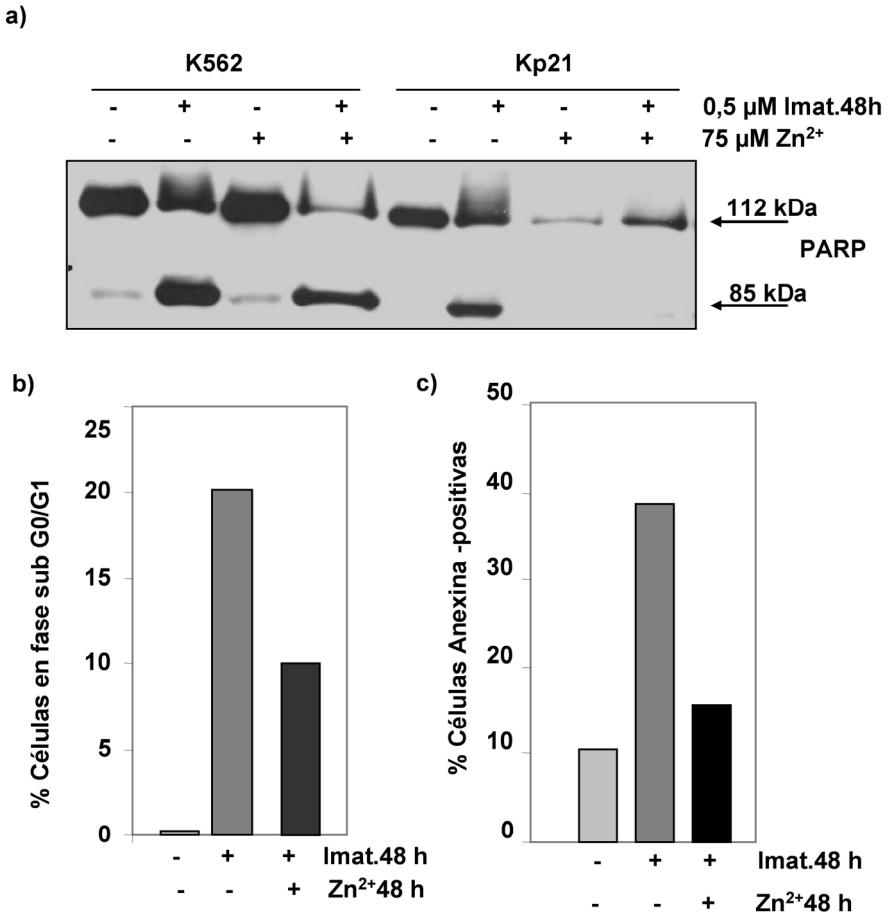


Fig 4.37 p21 protege de apoptosis inducida por imatinib en el modelo celular K562. Líneas celulares K562 y Kp21 con (Zn^{2+}) y sin (Zn^{2+}) inducción de p21 y tratadas (+) y sin tratar (-) con 0,5 µM imatinib durante 48 h. a) Análisis de la rotura proteolítica de PARP mediante western blot. La rotura proteolítica de PARP genera dos fragmentos, 112 kDa y 85 kDa. b) Estudio de la población en fase Sub-G0 mediante citometría de flujo. c) Estudio del porcentaje de células anexina positivas mediante citometría de flujo.

En resumen, el aumento de expresión de p21 protege a las células de la apoptosis provocada por imatinib en células mieloides K562 que no presentan expresión del factor de transcripción p53, a diferencia de lo encontrado en el modelo celular HCT116p21$^{-/-}$que presenta una sobre-expresión de p53.

4.2 Estudio de los perfiles de expresión génica asociados a la inducción de p21.

Como hemos mencionado en la introducción (ver Introducción 1.2.2), recientemente se le atribuye a p21 un papel como represor transcripcional sobre Wnt4, Myc, Cdc25A y sobre genes mitóticos, impidiendo así una segregación cromosómica inapropiada tras el daño al DNA (Chang et al., 2000a; Chang et al., 2000b; Devgan et al., 2005; Vigneron et al., 2006). Estos datos, le confieren a p21 propiedades de co-factor transcripcional.

Para profundizar en el papel p21 como posible represor transcripcional utilizamos el modelo celular Kp21, línea celular de LMC (K562), transfectada establemente con p21 inducible.

En este trabajo de Tesis, quisimos estudiar los efectos de p21 sobre la expresión génica, con el fin de encontrar posibles genes regulados por p21. En este estudio analizamos la expresión global de mRNAs mediante "microarray" con el biochip de Affimetrix HG-U133A (ver Materiales y Métodos 3.1.8), utilizando el programa informático "dChip" (www.hsph.harvard.edu/biostats/complab/dchip). Este biochip permite el análisis de la expresión de 14593 genes diferentes. Los experimentos se realizaron en células Kp21 a tiempos cortos (12 horas) y largos de expresión de p21 (72 horas). Como control de nuestros experimentos, se analizó la expresión de genes regulados por p27 en células Kp27 (línea celular derivada de K562 con expresión ectópica del cDNA de p27, controlado por el mismo promotor metalotioneína),y donde p27 también induce parada proliferativa (Munoz-Alonso et al., 2005). De este modo, se identificaron genes regulados específicamente por p21. A su vez, también se hibridó RNA total de células Kp21 y Kp27 sin tratar con Zn^{2+}, así como células K562 tratadas y sin tratar con Zn^{2+}, para descartar los genes regulados por el inductor. El análisis se realizó por duplicado, exceptuando la muestra de tiempo largo de expresión de p21. Cada una de las muestras duplicadas procedía de un experimento independiente. Con este análisis pretendíamos analizar qué genes varían su expresión por la inducción de p21 y no por p27. En la figura 4.38 se muestra la nomenclatura de las muestras y las comparativas analizadas.

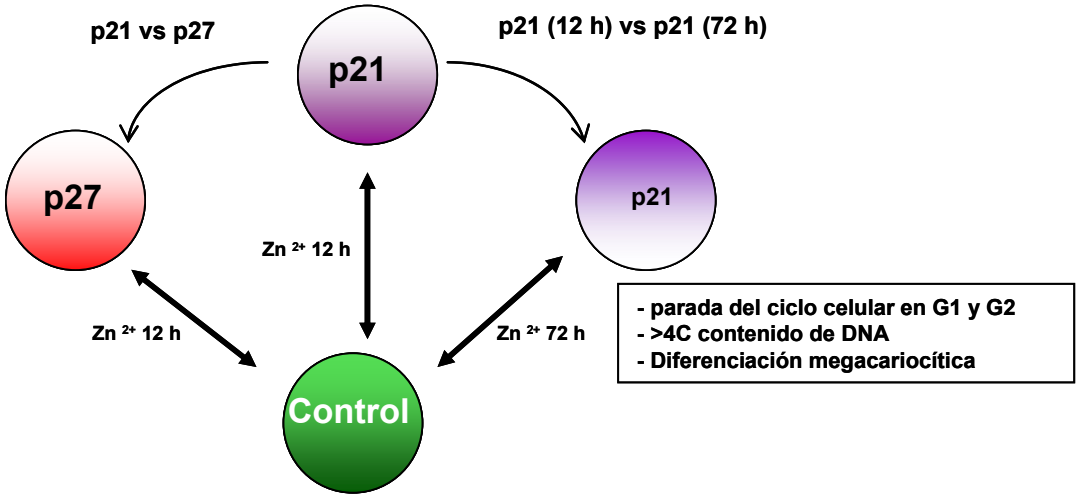


Fig 4.38 Esquema del experimento para el análisis del transcriptoma de las células con expresión condicional de p21. Las células Kp21, Kp27 o K562 se trataron con 75 µM ZnSO4 durante 12 h y 72 h como se indica. Posteriormente se extrajo el RNA total para su posterior análisis con el biochip HG-U133A. De la comparativa de los RNAs de las células que expresan p21 y de las que expresan p27 se pretendía encontrar aquellos genes regulados específicamente por p21. En el recuadro se muestra los efectos de la inducción de p21 sobre el ciclo celular y la diferenciación (Munoz-Alonso et al., 2005).

4.2.1 Agrupamiento jerárquico de genes expresados diferencialmente en respuesta a la inducción de p21 en K562.

En este estudio se usó como criterio de selección la represión o la inducción de al menos 2,3 veces ($\log_2$ 1,2). Como primera aproximación, se analizaron los genes que cambian su expresión con la inducción de p21 a tiempos largos (72 h) y a tiempos cortos (12 h) (fig 4.39). Para realizar este análisis descartamos aquellos genes regulados en respuesta a Zn^{2+} en K562 y los genes regulados por inducción de p27. El análisis de expresión comparativa de todo el experimento, reveló la existencia de 361 genes con expresión diferencial. En la figura 4.39 se muestra la distribución jerárquica ("clustering") de los genes y de las muestras agrupadas según las diferencias de expresión. Las muestras se distribuyen en dos grupos (fig 4.39): uno de ellos corresponde a las células con inducción de p21 (Kp21 tratadas con Zn^{2+} durante 12 h y 72 h) y el otro grupo formado por las células sin inducción de p21 y células con y sin activación de p27.

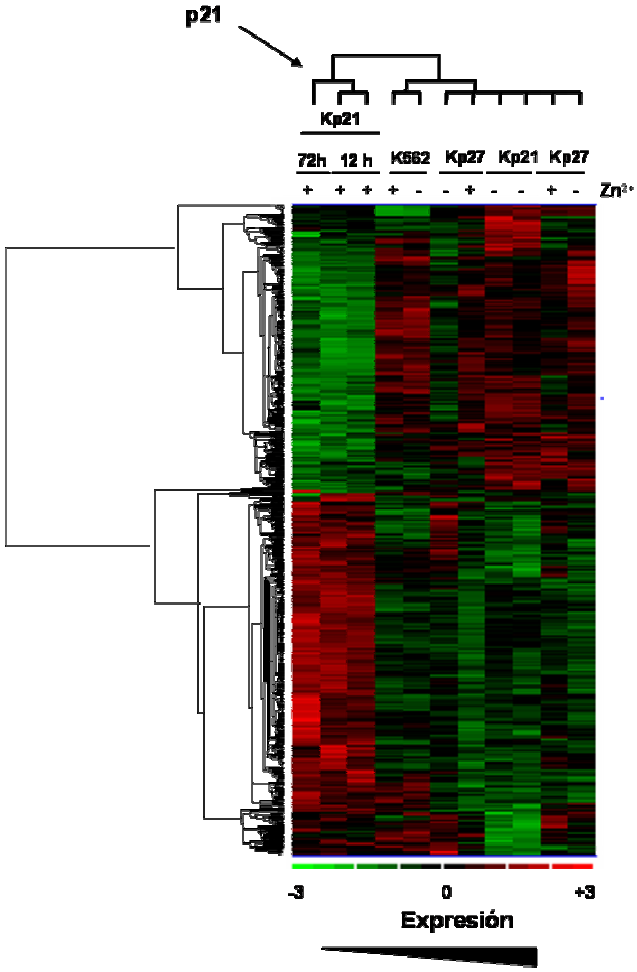


Fig 4,39 Agrupación jerárquica de genes agrupados por diferencia de expresión génica en respuesta a p21 tras 12 h y 72 h. Las muestras de RNA analizadas corresponden a células Kp21, Kp27 y K562 tratadas (+) o sin tratar (-) con Zn^{2+} durante 12 h o 3 días. Se filtraron aquellos genes con diferencias de expresión superior al 2,3 veces de las comparaciones kp21 (12 h Zn^{2+}) vs Kp21 control y Kp21 (72 h Zn^{2+}) vs Kp21 control. De las comparaciones se restaron aquellos inducidos o reprimidos por p27 en la comparación Kp27 (12 h Zn^{2+}) vs Kp27 control y aquellos genes inducidos o reprimidos por Zn^{2+} en K562 en la comparación K562 (12 h Zn^{2+}) vs K562 control. La expresión génica se muestra en escala logarítmica del verde (menor expresión) al rojo (mayor expresión).

4.2.2 Perfiles de expresión asociados a la inducción de p21 durante 12 h

Nuestro objetivo partía de la hipótesis de encontrar genes regulados transcripcionalmente por p21 en K562, como ya se había descrito en otros sistemas (ver Introducción 1.2.2). Resultados anteriores en nuestro laboratorio, determinaron la implicación de p21 en diferenciación megacariocítica a tiempos largos de expresión (72 h) (Munoz-Alonso et al., 2005). Por lo tanto, decidimos centrar nuestro estudio en tiempos

cortos de inducción de p21 para así identificar genes que sean objeto de regulación directa por p21.

A continuación, realizamos otro análisis aplicando los mismos niveles de restricción en la expresión de los genes (log_2 1,2), pero en este caso prescindíamos no sólo de los genes modulados por p27, sino también los genes modulados por p21 a tiempos largos (72 h), para identificar las "dianas primarias" de p21. En la figura 4.40 se muestra la distribución jerarquica ("clustering") de los 388 genes encontrados y de las muestras agrupadas según las diferencias de expresión.

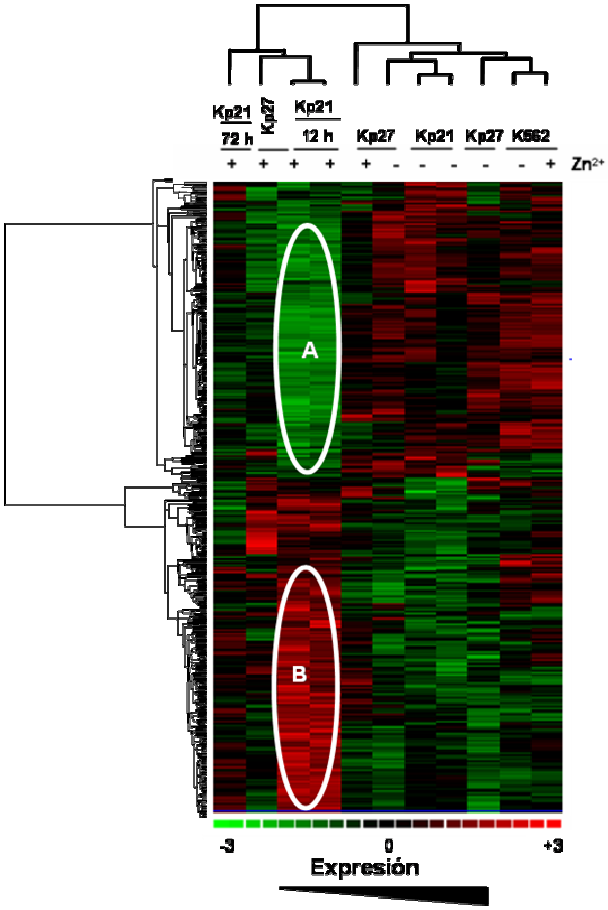


Fig 4.40 Agrupación jerárquica de genes agrupados por diferencia de expresión génica en respuesta a 12 h de inducción de p21. Las muestras de RNA analizadas corresponden a células Kp21, Kp27 y K562 tratadas (+) o sin tratar (-) con Zn^{2+} durante 12 h o 3 días. Se filtraron aquellos genes con diferencias de expresión superior al 2,3 veces de las comparaciones kp21 (12 h Zn^{2+}) vs Kp21 control. De las comparaciones se restaron aquellos inducidos o reprimidos por Kp21 (3 días Zn^{2+}) vs Kp21 control, los genes inducidos o reprimidos por p27 en la comparación Kp27 (12 h Zn^{2+}) vs Kp27 control y los genes inducidos o reprimidos por Zn^{2+} en K562 en la comparación K562 (12 h Zn^{2+}) vs K562 control. La expresión génica se muestra en escala logarítmica del verde (menor expresión) al rojo (mayor expresión). En el panel se muestran los grupos de genes con expresión diferencial entre las muestras Kp21 a las 12 h y 72 h de inducción de p21 (ver texto).

Las células se distribuyen en dos grupos (fig 4.40): uno representa a las células con expresión de p21 a tiempos cortos de inducción y otro, que engloba a las células que tienen expresión de p21 a tiempos largos y muestras sin expresión de p21. Este agrupamiento jerárquico, por comparación con las muestras control (Kp21 y Kp27 sin tratamiento con Zn^{2+} y K562 tratadas y no con Zn^{2+}) mostró 2 grupos de genes (fig 4.39):

1) Los genes en A están más reprimidos en la muestra con 12 h de inducción de p21 que con 72 h (señalados con A, fig 4.39)

2) Los genes en B están más inducidos en la muestra con 12 h de inducción de p21 que con 72 h (señalados con B, fig 4.39)

El agrupamiento funcional de los 388 genes cuya expresión está modificada por la inducción de p21 durante 12 h (fig 4.41), fue obtenido mediante la base de datos programa informático "dChip" (www.hsph.harvard.edu/biostats/complab/dchip). Este análisis indicó que el 33% de ellos participan en ciclo celular, mitosis o proliferación celular. El 35 % de los genes estaba implicado en crecimiento celular o mantenimiento celular. También se detectaron diferencias de expresión en genes implicados en otras funciones, como metabolismo del DNA (9 %), en la obtención de energía (4 %), en la reparación del DNA (5 %) y genes implicados en la cadena de transporte de electrones (2%).

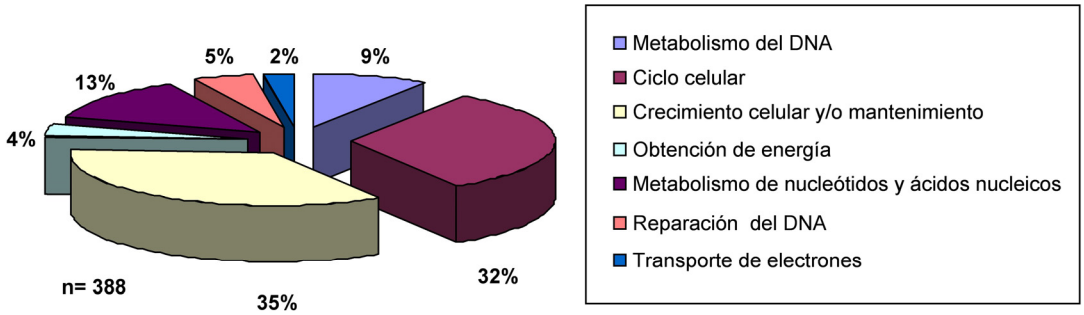
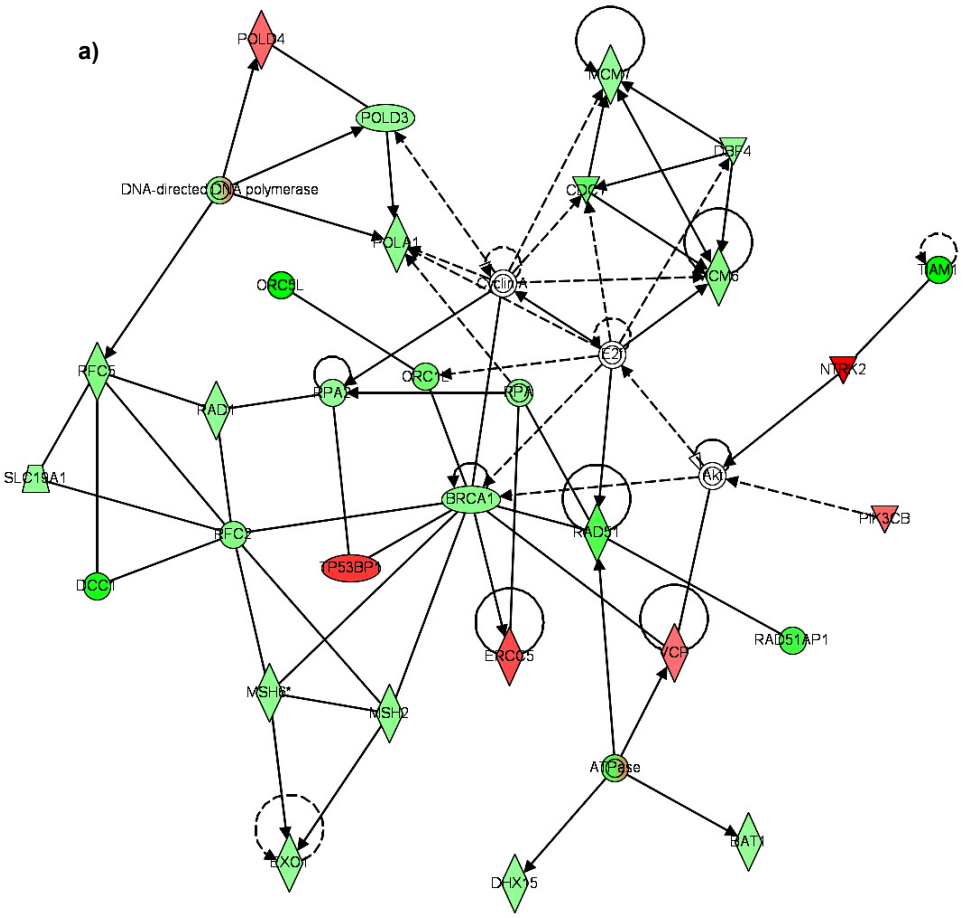


Fig 4.41 Agrupamiento funcional de los genes con expresión diferencial a 12 h de inducción de p21. Análisis de los 388 genes expresados diferencialmente según su función. Las funciones indicadas aparecen representadas utilizando un código de colores y los números adyacentes representan los porcentajes de representación con respecto al total de genes obtenido.

A continuación, decidimos analizar los datos de los microarrays con el programa informático “Ingenuity” (www.ingenuity.com) una aplicación que permite identificar conexiones moleculares, ya que relaciona cada gen de interés con una base de datos sobre interacciones físicas, transcripcionales o enzimáticas conocidas. De los 388 genes con cambio de expresión obtenido en “dChip”, el programa informático Ingenuity system reconoció 279 genes que cumplieron los requisitos para el análisis ontológico. De ellos, 137 genes estaban inducidos y 142 estaban reprimidos. En este análisis estudiamos las conexiones directas e indirectas que existían entre los genes del transcriptoma inducido por p21. Este análisis reveló la existencia de dos redes principales, que incluían genes implicados en replicación, recombinación, reparación del DNA y ciclo celular y cáncer.



b)

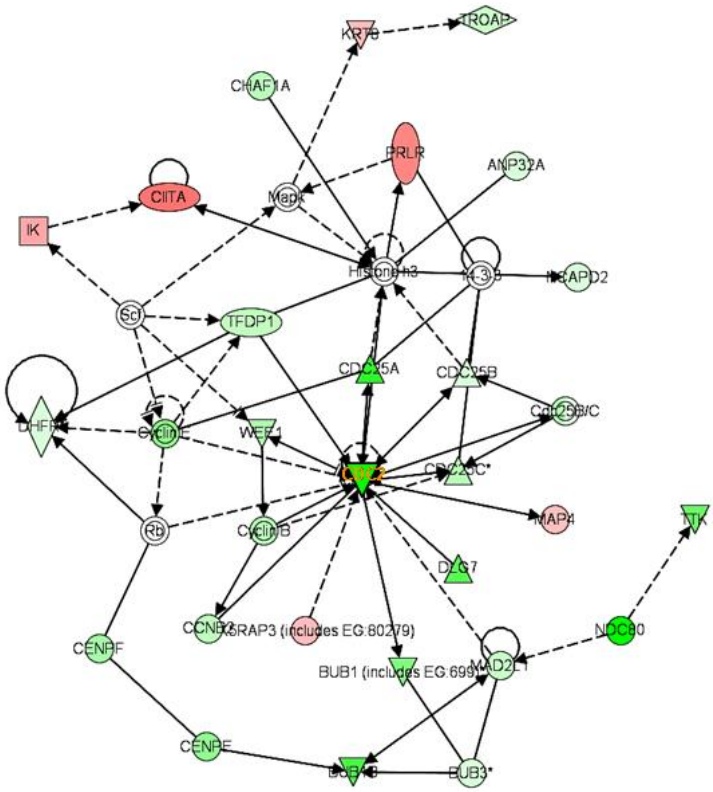


Fig 4.42 Principales redes de conexión para los genes regulados por la expresión ectópica de p21 durante 12 h. a) Red de replicación, recombinación, y reparación de DNA (página anterior), b) Red de ciclo celular y cáncer, el nodo central de la red es CDC2. Los nodos rojos representan genes inducidos y los verdes genes reprimidos, de acuerdo con el nivel de cambio respecto al análisis obtenido con el "dChip".

El resultado obtenido con el programa informático "Ingenuity System" nos orientó sobre las principales redes donde se hallaban los genes regulados por p21 a 12 h de inducción.

En las tablas 4.2 y 4.3 se muestra una descripción completa de los genes que presentaron expresión diferencial con la inducción de p21 (12 h) (fig 4.40). Estos genes vienen representados por el símbolo, la descripción, el Gene ID (número de identificación del banco de secuencias UniGene (www.ncbi.nlm.nih.gov)), el incremento $\log_2$ (media de dos experimentos independientes) y el cambio de expresión obtenido, en la validación por RT-PCR a las 12 h de inducción de p21 de algunos de los genes validados (datos descritos más adelante en las fig 4.47 y 4.49).

Tabla 4.2 Genes inducidos por p21

Símbolo	Gene	Gene ID	Incremento (log_2)	Cambio RT-PCR
GREB1	GREB1 protein	9687	19,41	
SLC16A4	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 4	9122	6,47	
CRIP2	Hypothetical protein MGC27165	283650	5,02	
PHF20L1	PHD finger protein 20-like 1	51105	3,78	
RGS5	regulator of G-protein signalling 5	8490	3,21	
KCTD14	potassium channel tetramerisation domain containing 14	65987	3,17	
EHBP1	EH domain binding protein 1	23301	3,13	
NTRK2	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	4915	3,04	
CRIP2	cysteine-rich protein 2	1397	2,73	
Hs.464137	acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	51	2,69	
CD3G	CD3G antigen, gamma polypeptide (TiT3 complex)	917	2,38	
GOLGA2	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 2	2801	2,34	
AKR1C4	aldo-keto reductase family 1, member C4 (chlordecone reductase; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type I; dihydrodiol dehydrogenase 4)	1109	2,34	
HCG9	HLA complex group 9	10255	2,29	
SLC22A18	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 18	5002	2,27	
WIPF1	Wiskott-Aldrich syndrome protein interacting protein	7456	2,26	
OSBPL1A	oxysterol binding protein-like 1A	114876	2,26	
LGALS8	lectin, galactoside-binding, soluble, 8 (galectin 8)	3964	2,2	
TGFB2	transforming growth factor, beta 2	7042	2,19	
EHD1	EH-domain containing 1	10938	2,18	
TF	transferrin	7018	2,14	
TFE3	transcription factor binding to IGHM enhancer 3	7030	2,11	
CAPN3	calpain 3, (p94)	825	2,1	
CEP63	centrosome protein Cep63	80254	2,05	
SLCO2B1	solute carrier organic anion transporter family, member 2B1	11309	2,04	
LRP12	low density lipoprotein-related protein 12	29967	2,03	
ABHD2	abhydrolase domain containing 2	11057	2,03	
ZNF324	zinc finger protein 324	25799	2	
LRP12	low density lipoprotein-related protein 12	29967	2	
TANK	TRAF family member-associated NFKB activator	10010	1,99	
HPGD	hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)	3248	1,98	
SHC1	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1	6464	1,98	
CIITA	MHC class II transactivator	4261	1,97	
MLLT11	ALL1-fused gene from chromosome 1q	10962	1,97	5,76
KIAA1609	KIAA1609 protein	57707	1,95	
GOLGA2	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 2	2801	1,95	
BRWD1	WD repeat domain 9	54014	1,91	
TP53BP1	tumor protein p53 binding protein, 1	7158	1,9	
ZER1	chromosome 9 open reading frame 60	10444	1,89	
ABHD2	abhydrolase domain containing 2	11057	1,88	
MAT1A	methionine adenosyltransferase I, alpha	4143	1,87	
MED25	mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 25 homolog (yeast)	81857	1,87	
KIAA0404	KIAA0404 protein	23130	1,86	
CCHCR1	coiled-coil alpha-helical rod protein 1	54535	1,85	
HDAC5	histone deacetylase 5	10014	1,85	
MEIS1	Meis1, myeloid ecotropic viral integration site 1 homolog (mouse)	4211	1,83	
	Hypothetical LOC388969	388969	1,83	
LOC92482	hypothetical protein LOC92482	92482	1,82	
AKR1C2	aldo-keto reductase family 1, member C2 (dihydrodiol dehydrogenase 2; bile acid binding protein; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type III)	1646	1,81	
LAMB3	laminin, beta 3	3914	1,8	
PRLR	prolactin receptor	5618	1,8	
RRBP1	Ribosome binding protein 1 homolog 180kDa (dog)	6238	1,78	
CRAT	carnitine acetyltransferase	1384	1,78	
WDR37	WD repeat domain 37	22884	1,78	
STX12	syntaxin 12	23673	1,78	
AV718487	Consensus includes gb:		1,77	

Símbolo	Gene	Gene ID	Incremento (log_2)	Cambio RT-PCR
SCAMP1	secretory carrier membrane protein 1	9522	1,76	
ACADSB	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain	36	1,74	
MLN	motilin	4295	1,74	
SALL2	sal-like 2 (Drosophila)	6297	1,74	
DPP3	dipeptidylpeptidase 3	10072	1,74	
TMEM134	transmembrane protein 134	80194	1,73	
PLCL1	phospholipase C-like 1	5334	1,72	
RBM8A	RNA binding motif protein 8A	9939	1,72	
RCBTB2	chromosome condensation 1-like	1102	1,71	
CDH19	cadherin 19, type 2	28513	1,71	
CSF1	colony stimulating factor 1 (macrophage)	1435	1,71	
ARHGEF6	Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6	9459	1,71	
ALDH1A1	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1	216	1,71	
GTF3C1	general transcription factor IIIC, polypeptide 1, alpha 220kDa	2975	1,7	
ERCC5	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5	2073	1,7	
ZMIZ1	retinoic acid induced 17	57178	1,68	
LOC282997	hypothetical protein LOC282997	282997	1,68	
CPNE3	copine III	8895	1,67	
KLHDC2	kelch domain containing 2	23588	1,67	
EIF1AY	eukaryotic translation initiation factor 1A, Y-linked	9086	1,66	
SLC35A3	solute carrier family 35 (UDP-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) transporter), member A3	23443	1,66	
MAPRE3	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 3	22924	1,65	
PPP2R5B	protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), beta isoform	5526	1,65	
CYB5R1	NAD(P)H:quinone oxidoreductase type 3, polypeptide A2	51706	1,64	
GLRX	glutaredoxin (thioltransferase)	2745	1,64	
GYS1	glycogen synthase 1 (muscle)	2997	1,63	
GABRE	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, epsilon	2564	1,63	
LGALS8	lectin, galactoside-binding, soluble, 8 (galectin 8)	3964	1,63	
COPB2	coatomer protein complex, subunit beta 2 (beta prime)	9276	1,62	
LOH11CR2A	loss of heterozygosity, 11, chromosomal region 2, gene A	4013	1,62	
UBR2	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 2	23304	1,62	
MBTPS1	membrane-bound transcription factor protease, site 1	8720	1,6	
CYBA	cytochrome b-245, alpha polypeptide	1535	1,6	
CDK10	cyclin-dependent kinase (CDC2-like) 10	8558	1,6	
STX4	syntaxin 4A (placental)	6810	1,6	
HARSL	histidyl-tRNA synthetase-like	23438	1,6	
SOX12	SRY (sex determining region Y)-box 12	6666	1,59	
LIG4	ligase IV, DNA, ATP-dependent	3981	1,59	
ME1	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	4199	1,58	
CPNE3	copine III	8895	1,57	
ATP2C1	ATPase, Ca++ transporting, type 2C, member 1	27032	1,57	
CNOT2	CCR4-NOT transcription complex, subunit 2	4848	1,57	
BC058818	Chloride channel 3	1182	1,56	
VPS16	vacuolar protein sorting 16 (yeast)	64601	1,56	
EML3	echinoderm microtubule associated protein like 3	256364	1,56	
MAN2C1	mannosidase, alpha, class 2C, member 1	4123	1,55	
TRIP4	thyroid hormone receptor interactor 4	9325	1,55	
NUMB	numb homolog (Drosophila)	8650	1,55	
JMJD2B	jumonji domain containing 2B	23030	1,55	
SWAP70	SWAP-70 protein	23075	1,54	
ZNF32	zinc finger protein 32 (KOX 30)	7580	1,54	
TRPM4	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 4	54795	1,54	
CTR9	SH2 domain binding protein 1 (tetratricopeptide repeat containing)	9646	1,53	
STXBP3	syntaxin binding protein 3	6814	1,53	
RABL2B	RAB, member of RAS oncogene family-like 2B	11158	1,52	
GSN	gelsolin (amyloidosis, Finnish type)	2934	1,51	
SPTLC2	serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 2	9517	1,51	
HS2ST1	heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1	9653	1,51	
AHNAK	AHNAK nucleoprotein (desmoyokin)	79026	1,51	
IK	IK cytokine, down-regulator of HLA II	3550	1,5	
AK074259	Pleckstrin homology domain containing, family B (evectins) member 2	55041	1,5	
MEF2C	MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide C (myocyte enhancer factor 2C)	4208	1,5	
<NLK	nemo like kinase	51701	1,5	
IFT52	chromosome 20 open reading frame 9	51098	1,5	
PEX19	peroxisomal biogenesis factor 19	5824	1,49	

Símbolo	Gene	Gene ID	Incremento (log_2)	Cambio RT-PCR
ZFP95	zinc finger protein 95 homolog (mouse)	23660	1,49	
IFNGR1	interferon gamma receptor 1 /// interferon gamma receptor 1	3459	1,49	
FNBP1	formin binding protein 1	23048	1,49	
MICAL2	microtubule associated monoxygenase, calponin and LIM domain containing 2	9645	1,49	
IGHD	immunoglobulin heavy constant delta	3495	1,49	
GSTM2	glutathione S-transferase M2 (muscle)	2946	1,48	
DNAJB6	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 6	10049	1,48	
NIPSNAP3B	nipsnap homolog 3B (C. elegans)	55335	1,48	
DCTN2	dynactin 2 (p50)	10540	1,47	
ACBD3	acyl-Coenzyme A binding domain containing 3	64746	1,47	
SLC25A40	mitochondrial carrier family protein	55972	1,47	
KDELR3	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 3	11015	1,47	
ZNF289	zinc finger protein 289, ID1 regulated	84364	1,47	
SERPINB1	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1	1992	1,47	
PIK3CB	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, beta polypeptide	5291	1,47	
ARL6IP5	ADP-ribosylation-like factor 6 interacting protein 5	10550	1,46	
KIAA1033	KIAA1033	23325	1,46	
WDR26	WD repeat domain 26	80232	1,46	
MECR	nuclear receptor binding factor 1	51102	1,46	
IPPK	chromosome 9 open reading frame 12	64768	1,46	
RBKS	ribokinase	64080	1,45	
TOB1	transducer of ERBB2, 1	10140	1,45	
BCL2L1	BCL2-like 1	598	1,45	
PRMT3	HMT1 hnRNP methyltransferase-like 3 (S. cerevisiae)	10196	1,45	
PLSCR3	phospholipid scramblase 3	254863	1,44	
POLD4	polymerase (DNA-directed), delta 4	57804	1,44	
CASP9	caspase 9, apoptosis-related cysteine protease	842	1,44	
CCNG1	cyclin G1	900	1,44	
PSCD2	pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains 2 (cytohesin-2)	9266	1,44	
RHOQ	ras homolog gene family, member Q	23433	1,44	
TAOK3	TAO kinase 3	51347	1,44	
RAB11A	RAB11A, member RAS oncogene family	8766	1,43	
SPATA2	spermatogenesis associated 2	9825	1,43	
CLPX	ClpX caseinolytic protease X homolog (E. coli)	10845	1,43	
DYNC1H1	dynein, cytoplasmic, heavy polypeptide 1	1778	1,42	
TRAF3IP2	TRAF3 interacting protein 2	10758	1,42	
SERINC3	tumor differentially expressed 1	10955	1,41	
RELA	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3, p65 (avian)	5970	1,4	
SLC4A1AP	solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1, adaptor protein	22950	1,4	
ACTR2	ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)	10097	1,39	
MYB	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)	4602	1,39	
VCP	valosin-containing protein	7415	1,39	
BECN1	beclin 1 (coiled-coil, myosin-like BCL2 interacting protein)	8678	1,39	
C20orf44	chromosome 20 open reading frame 44	55245	1,39	
VPS13C	vacuolar protein sorting 13C (yeast)	54832	1,39	
SERINC1	tumor differentially expressed 2	57515	1,38	
C9orf6	hypothetical protein FLJ20457	54942	1,38	
ACO2	aconitase 2, mitochondrial	50	1,37	
PARP4	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 4	143	1,37	
MFSD1	major facilitator superfamily domain containing 1	64747	1,37	
CTSB	cathepsin B	1508	1,36	
AHCYL1	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1	10768	1,35	
FLJ20254	Hypothetical protein FLJ20254	54867	1,35	
KRT8	keratin 8	3856	1,33	
PRKCB1	protein kinase C, beta 1	5579	1,33	
CDK5RAP3	CDK5 regulatory subunit associated protein 3	80279	1,32	
KIAA0196	KIAA0196 gene product	9897	1,31	
MAP4	microtubule-associated protein 4	4134	1,3	

Tabla 4.3 Genes reprimidos por p21

Símbolo	Gene	Gene ID	Incremento (Log_2)	Cambio RT-PCR
UMPS	uridine monophosphate synthetase (orotate phosphoribosyl transferase and orotidine-5'-decarboxylase)	7372	-1,3	
ANP32A	Acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A	8125	-1,35	
TUBB2C	tubulin, beta, 2	10383	-1,36	
UBE2N	ubiquitin-conjugating enzyme E2N (UBC13 homolog, yeast)	7334	-1,37	
COCH	coagulation factor C homolog, cochlin (Limulus polyphemus)	1690	-1,37	
FUSIP1	FUS interacting protein (serine-arginine rich) 1	10772	-1,38	
C20orf67	Cluster Incl. AI743331:wg91f07.		-1,39	
PHF10	PHD finger protein 10	55274	-1,4	
BAT1	HLA-B associated transcript 1	7919	-1,41	
PPM1G	protein phosphatase 1G (formerly 2C), magnesium-dependent, gamma isoform	5496	-1,41	
C7orf24	chromosome 7 open reading frame 24	79017	-1,43	
PXMP2	peroxisomal membrane protein 2, 22kDa	5827	-1,43	
SMC1A	SMC1 structural maintenance of chromosomes 1-like 1 (yeast)	8243	-1,44	
SLC19A1	solute carrier family 19 (folate transporter), member 1	6573	-1,44	
PARP2	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 2	10038	-1,44	
NR2F2	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2	7026	-1,45	
KLHL23	hypothetical protein MGC2610	151230	-1,45	
ACTL6A	actin-like 6A	86	-1,46	
CAD	carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase	790	-1,46	
PNN	pinin, desmosome associated protein	5411	-1,46	
CHORDC1	cysteine and histidine-rich domain (CHORD)-containing, zinc binding protein 1	26973	-1,46	
KPNA2	karyopherin alpha 2 (RAG cohort 1, importin alpha 1)	3838	-1,47	
NUDT15	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 15	55270	-1,47	
SPHK1	sphingosine kinase 1	8877	-1,49	
CDC25B	cell division cycle 25B	994	-1,5	
UMPS	uridine monophosphate synthetase (orotate phosphoribosyl transferase and orotidine-5'-decarboxylase)	7372	-1,51	
CTPS	CTP synthase	1503	-1,52	
RAD1	RAD1 homolog (S. pombe)	5810	-1,52	
DHX15	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 15	1665	-1,53	
RPL39L	ribosomal protein L39-like	116832	-1,53	
TMEM97	hypothetical protein MAC30	27346	-1,53	
LOC221362	hypothetical protein LOC221362	221362	-1,53	
GCH1	GTP cyclohydrolase 1 (dopa-responsive dystonia)	2643	-1,54	
TLR2	toll-like receptor 2	7097	-1,55	
ESPL1	extra spindle poles like 1 (S. cerevisiae)	9700	-1,56	
RPA2	replication protein A2, 32kDa	6118	-1,56	
HNRPAB	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	3182	-1,58	
THOC1	THO complex 1	9984	-1,58	
CTSC	cathepsin C	1075	-1,59	
DHFR	dihydrofolate reductase	1719	-1,59	0,18
HIVEP1	human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 1	3096	-1,59	
POLD3	polymerase (DNA-directed), delta 3, accessory subunit	10714	-1,59	
DSN1	chromosome 20 open reading frame 172	79980	-1,59	
VRK1	vaccinia related kinase 1	7443	-1,6	
CKS2	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	1164	-1,6	
DBF4	activator of S phase kinase	10926	-1,6	
DUT	dUTP pyrophosphatase	1854	-1,6	
MARCKSL1	MARCKS-like 1	65108	-1,61	
TEAD4	TEA domain family member 4	7004	-1,61	
NCAPH2	hypothetical protein 384D8_6	29781	-1,61	
DBNDD2	chromosome 20 open reading frame 35	55861	-1,62	
BUB3	BUB3 budding uninhibited by benzimidazoles 3 homolog (yeast)	9184	-1,62	0,68
EXO1	exonuclease 1	9156	-1,65	
KNTC1	kinetochore associated 1	9735	-1,65	
UCHL5IP	three prime repair exonuclease 2	11219	-1,65	
CDCA4	cell division cycle associated 4	55038	-1,65	

Símbolo	Gene	Gene ID	Incremento (Log_2)	Cambio RT-PCR
WHSC1	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1	7468	-1,67	
MAFB	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)	9935	-1,67	
DNMT1	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	1786	-1,69	
RBBP8	retinoblastoma binding protein 8	5932	-1,69	
CIT	citron (rho-interacting, serine/threonine kinase 21)	11113	-1,69	
MCM7	MCM7 minichromosome maintenance deficient 7 (S. cerevisiae)	4176	-1,71	
CCDC99	hypothetical protein FLJ20364	54908	-1,71	
IMPA2	inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 2	3613	-1,73	
SLC29A1	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 1	2030	-1,75	
BTG3	BTG family, member 3	10950	-1,75	
NR2F2	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2	7026	-1,75	
SLC29A1	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 1	2030	-1,76	
NCAPD2	chromosome condensation-related SMC-associated protein 1	9918	-1,78	
PMAIP1	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	5366	-1,79	
AGR2	anterior gradient 2 homolog (Xenopus laevis)	10551	-1,8	
KIAA0101	KIAA0101 /// KIAA0101	9768	-1,82	
NUP210	nucleoporin 210kDa	23225	-1,83	
PLSCR1	phospholipid scramblase 1	5359	-1,84	
MSH6	mutS homolog 6 (E. coli)	2956	-1,84	
DHRS2	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2	10202	-1,84	
PTMA	prothymosin, alpha (gene sequence 28)	440085	-1,84	
MSH6	mutS homolog 6 (E. coli)	2956	-1,84	
CKAP2	cytoskeleton associated protein 2	26586	-1,84	
TCOF1	Treacher Collins-Franceschetti syndrome 1	6949	-1,85	
LAMA4	laminin, alpha 4	3910	-1,85	
TMEM97	hypothetical protein MAC30	27346	-1,85	
MSH2	mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)	4436	-1,86	
BTG3	BTG family, member 3	10950	-1,86	
NCAPD3	KIAA0056 protein	23310	-1,87	
CD200	CD200 antigen	4345	-1,9	
FAM111A	FLJ22794 protein	63901	-1,9	
UBE2S	ubiquitin-conjugating enzyme E2S	27338	-1,91	
POLA1	polymerase (DNA directed), alpha	5422	-1,92	
RECQL4	Consensus includes gb:NM_004260.1		-1,93	
BRCA1	breast cancer 1, early onset	672	-1,94	
DTYMK	deoxythymidylate kinase (thymidylate kinase)	1841	-1,95	
AF116705	gb:AF116705.1 /DEF=Homo sapiens.1		-1,97	
AURKA	serine/threonine kinase 6	6790	-1,96	0,3
SPAG5	sperm associated antigen 5	10615	-1,99	
TROAP	trophinin associated protein (tastin)	10024	-2,01	
SLC43A3	solute carrier family 43, member 3	29015	-2,01	
TRA@	T cell receptor alpha locus	28755	-2,02	
MCM6	MCM6 minichromosome maintenance deficient 6 (MIS5 homolog, S. pombe)	4175	-2,03	
MAD2L1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	4085	-2,03	0,46
RFC5	replication factor C (activator 1) 5, 36.5kDa	5985	-2,04	
TRAIP	TRAF interacting protein	10293	-2,04	
RFC2	replication factor C (activator 1) 2, 40kDa	5982	-2,08	
NM_014092	gb:NM_014092.1 /DEF=Homo sapiens PRO1575		-2,09	
NASP	nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding)	4678	-2,11	
GINS3	hypothetical protein FLJ13912	64785	-2,11	
TFDP1	transcription factor Dp-1	7027	-2,17	
KIAA1794	hypothetical protein FLJ10719	55215	-2,17	
AF070564	Clone 24571 mRNA sequence		-2,17	
WDHD1	WD repeat and HMG-box DNA binding protein 1	11169	-2,18	
HIST1H2BG	histone 1, H2bg	8339	-2,19	
CENPN	uncharacterized bone marrow protein BM039	55839	-2,19	
CCNF	cyclin F	899	-2,22	
DONSON	downstream neighbor of SON	29980	-2,22	
DEK	DEK oncogene (DNA binding)	7913	-2,24	
CCNB2	cyclin B2	9133	-2,24	0,22
CDC25C	cell division cycle 25C	995	-2,26	
CENPM	chromosome 22 open reading frame 18	79019	-2,26	
CENPQ	chromosome 6 open reading frame 139	55166	-2,28	
CHAF1A	chromatin assembly factor 1, subunit A (p150)	10036	-2,29	
KIAA0286	KIAA0286 protein	23306	-2,3	
CDC25C	cell division cycle 25C	995	-2,31	

Símbolo	Gene	Gene ID	Incremento (Log_2)	Cambio RT-PCR
ORC1L	origin recognition complex, subunit 1-like (yeast)	4998	-2,33	0,33
RACGAP1	Rac GTPase activating protein 1	29127	-2,35	
HMGB3	high-mobility group box 3	3149	-2,41	
B3GALNT1	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 3	8706	-2,46	
WEE1	WEE1 homolog (S. pombe)	7465	-2,47	0,35
CDT1	DNA replication factor	81620	-2,48	
FHL1	four and a half LIM domains 1	2273	-2,48	
NCAPG2	more than blood homolog	54892	-2,49	
CYP2C18	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 18	1562	-2,54	
LOC146909	hypothetical protein LOC146909	146909	-2,54	
AK124872	Similar to BMP2 inducible kinase	388957	-2,6	
CDC7	CDC7 cell division cycle 7 (S. cerevisiae)	8317	-2,61	
CENPF	centromere protein F, 350/400ka (mitosin)	1063	-2,63	0,23
CCNF	cyclin F	899	-2,64	
WDHD1	WD repeat and HMG-box DNA binding protein 1	11169	-2,68	
MKI67	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	4288	-2,77	
HMMR	hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	3161	-2,79	
RAD51	RAD51 homolog (RecA homolog, E. coli) (S. cerevisiae)	5888	-2,84	
DTL	RA-regulated nuclear matrix-associated protein	51514	-2,92	
CENPE	centromere protein E, 312kDa	1062	-2,93	
CCNE2	cyclin E2	9134	-2,97	0,063
CNIH3	cornichon homolog 3 (Drosophila)	149111	-3,03	
BUB1	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast)	699	-2,72	0,51
RAD51AP1	RAD51 associated protein 1	10635	-3,05	
WDHD1	WD repeat and HMG-box DNA binding protein 1	11169	-3,19	
DEPDC1	DEP domain containing 1	55635	-3,2	
C18orf24	chromosome 18 open reading frame 24	220134	-3,24	
FEN1	flap structure-specific endonuclease 1	2237	-3,27	
AOX1	aldehyde oxidase 1	316	-3,31	
MKI67	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	4288	-3,37	
LOC392454	Consensus includes gb:AL034410 /DEF=Human DNA sequence		-3,45	
TTK	TTK protein kinase	7272	-3,63	
DCC1	defective in sister chromatid cohesion homolog 1 (S. cerevisiae)	79075	-3,67	
SHCBP1	SHC SH2-domain binding protein 1	79801	-3,67	
DLG7	discs, large homolog 7 (Drosophila)	9787	-3,77	
GPSM2	G-protein signalling modulator 2 (AGS3-like, C. elegans)	29899	-4,1	
BUB1B	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta (yeast)	701	-4,13	
KIF2C	kinesin family member 2C	11004	-4,25	0,14
CDC25A	cell division cycle 25A	993	-4,5	
CDC2	Cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	983	-4,95	
CENPA	centromere protein A, 17kDa	1058	-5,09	
KIF23	kinesin family member 23	9493	-5,17	
KNTC2	kinetochore associated 2	10403	-6,03	
ARHGAP11A	Rho GTPase activating protein 11A	9824	-6,05	
ASPM	asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (Drosophila)	259266	-6,71	
HAS1	hyaluronan synthase 1	3036	-7,15	
TIAM1	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1	7074	-7,63	
ORC5L	origin recognition complex, subunit 5-like (yeast)	5001	-8,97	
TNFRSF10C	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c, decoy without an intracellular domain	8794	-10,93	
LGR5	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5	8549	-12	
KIF20A	kinesin family member 20A	10112	-12,42	

Para seguir investigando el conjunto de genes que modifican su expresión génica a tiempos cortos de inducción de p21, aumentamos el criterio de expresión a log_2 2,3 (5 veces) (fig 4.43.a). Era un criterio muy restrictivo donde pretendíamos confirmar los datos obtenidos con el programa infórmático “Ingenuity”.

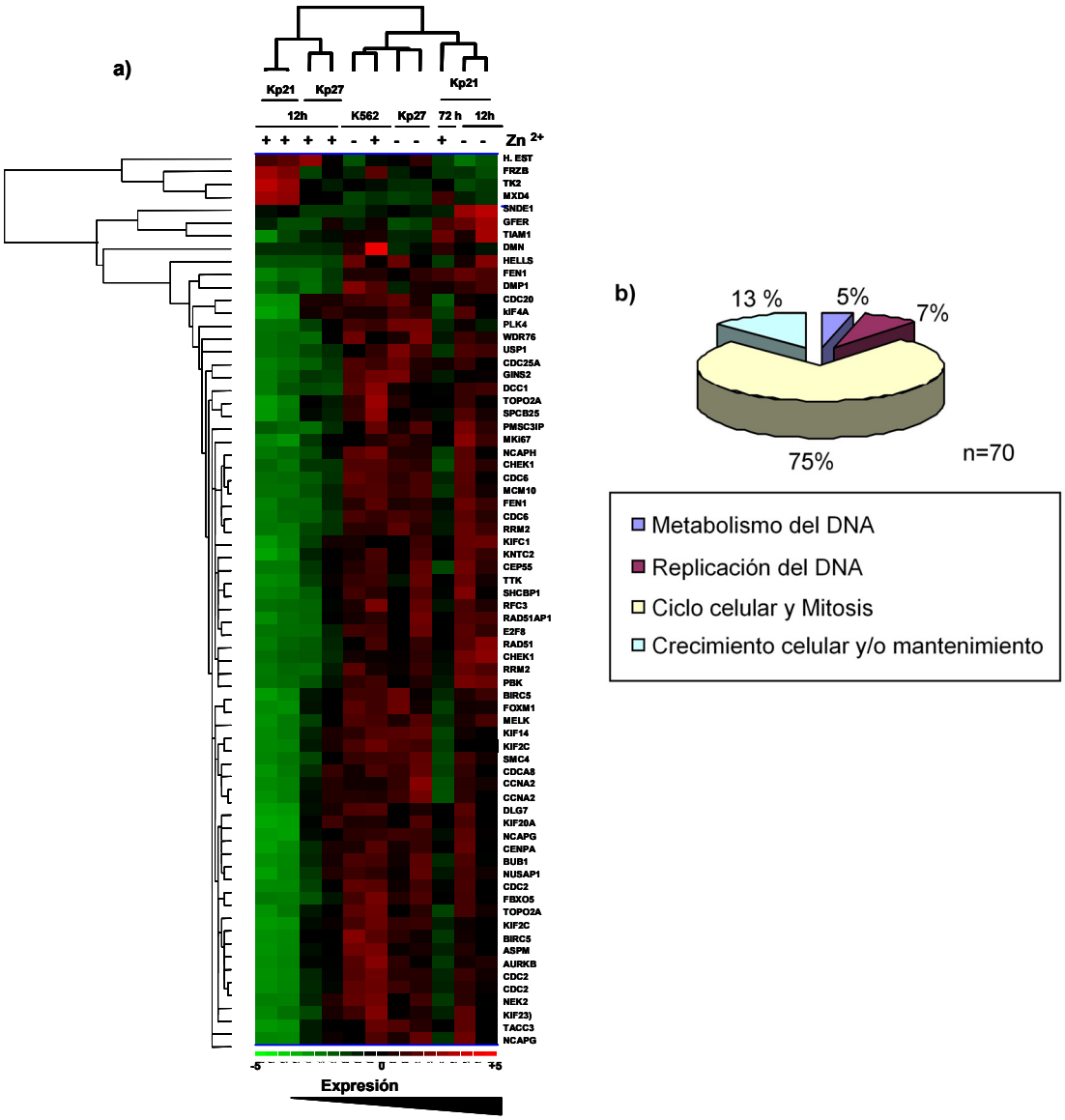


Fig 4.43 Agrupación de genes por diferencia de expresión génica en respuesta a 12 h de inducción de p21. Las muestras de RNA analizadas corresponden a células Kp21, Kp27 y K562 tratadas (+) o sin tratar (-) con Zn^{2+} durante 12 h o 3 d. Se filtraron aquellos genes con diferencias de expresión superior al 5 veces de las comparaciones kp21 (12 h Zn^{2+}) vs Kp21 control. De las comparaciones se restaron aquellos inducidos o reprimidos por Kp21 (12 h Zn^{2+}) vs Kp21 control, los genes inducidos o reprimidos por p27 en la comparación Kp27 (12 h Zn^{2+}) vs Kp27 control y los genes inducidos o reprimidos por Zn^{2+} en K562 en la comparación K562 (12 h Zn^{2+}) vs K562 control. a) Agrupación jerárquica de los genes con expresión diferencial). La expresión génica se muestra en escala logarítmica del verde (menor expresión) al rojo (mayor expresión). En el panel se muestran los 70 genes que cambian su expresión con p21 a 12 h de inducción y un criterio de expresión $\log_2$ 2,3 (5 veces de expresión). b) Agrupamiento funcional de los 70 genes expresados diferencialmente según su función. Las funciones indicadas aparecen representadas utilizando un código de colores y los números adyacentes representan los porcentajes de representación con respecto al total de genes.

En este nuevo análisis, hallamos un total de 70 genes, de los cuales 66 eran reprimidos y 4 eran inducidos por la expresión de p21 a tiempos cortos. Estos genes no modifican su expresión por la inducción de p27 o p21 a tiempos largos de tratamiento con Zn^{2+}. En el primer alineamiento jerárquico, se observa como las muestras con inducción de p21 o de p27 son agrupadas en un grupo independiente al resto de las muestras sin inducción o con inducción de p21 a tiempos largos. En la figura 4.43.b, podemos observar el agrupamiento funcional obtenido mediante la base de datos del software "dchip" (www.hsph.harvard.edu/biostats/complab/dchip); el 75 % de los genes están relacionados con la progresión de ciclo celular y mitosis (ver Resultados 4.2.3.2) y el 25 % restante de los genes están relacionados con metabolismo del DNA, replicación y crecimiento celular y/o mantenimiento. Cabe resaltar, que la represión de muchos de estos genes es más acusada con la inducción de p21 que con p27, a pesar de ser los dos inhibidores del ciclo celular. Este análisis de expresión tan restrictivo, mostraba diferencias en genes modificados por p21 a tiempos largos de inducción y a tiempos cortos. La mayoría de genes reprimidos a tiempos cortos de expresión por p21 presentan una recuperación de su expresión a tiempos largos de inducción. Este efecto podría explicarse porque los niveles de p21 con 72 h de tratamiento con Zn^{2+} son menores que con 12 h de inducción (fig 4.43.a). Este análisis nos sugirió centrar nuestra búsqueda en genes relacionados con ciclo celular y mitosis, con la posibilidad de poder encontrar genes regulados transcripcionalmente por p21, en condiciones de cambio de expresión a 2,3 veces (log_2 1.2).

4.2.3 Genes implicados en la progresión del ciclo celular, mitosis y replicación del DNA

4.2.3.1 Perfil de la expresión génica.

Realizamos un estudio más profundo en el análisis obtenido en la figura 4.40. De los 388 genes que modificaban su expresión en presencia de p21 tras 12 h de inducción, tán solo 65 estaban relacionados con ciclo celular, mitosis y replicación del DNA. De estos 65 genes, hallamos 10 con expresión inducida por p21 y 55 con expresión reprimida (fig 4.44). El análisis del agrupamiento jerárquico (fig 4.44) mostraba dos grupos; uno corresponde a las muestras con inducción de p21 o p27 y otro a las

muestras control. Además, las muestras con inducción de p21 (tiempos de 12 h y 3 días) se diferenciaban de las muestras con inducción de p27.

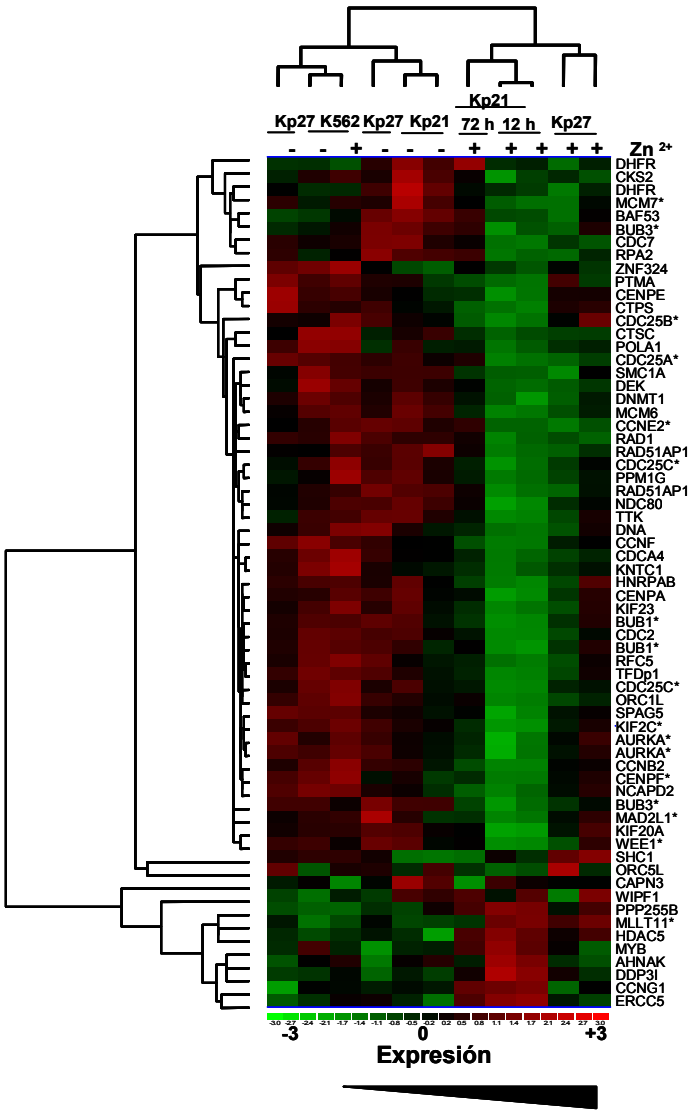


Fig 4.44 Agrupación jerárquica de genes relacionados con ciclo celular, replicación de DNA y mitosis, agrupados por diferencia de expresión génica en respuesta a 12 h de inducción de p21. Las muestras de RNA analizadas corresponden a células Kp21, Kp27 y K562 tratadas (+) o sin tratar (-) con Zn^{2+} durante 12 h o 3 días. Se filtraron aquellos genes con diferencias de expresión superior al 2,3 veces de las comparaciones kp21 (12 h Zn^{2+}) vs Kp21 control. De las comparaciones se restaron aquellos inducidos o reprimidos por Kp21 (3 días Zn^{2+}) vs Kp21 control, los genes inducidos o reprimidos por p27 en la comparación Kp27 (12 h Zn^{2+}) vs Kp27 control y los genes inducidos o reprimidos por 75 µM Zn^{2+} en K562 en la comparación K562 (12 h Zn^{2+}) vs K562 control. La expresión génica se muestra en escala logarítmica del verde (menor expresión) al rojo (mayor expresión). En el panel se muestran los 67 genes que cambian su expresión con p21 a 12 h de inducción y un criterio de expresión log_2 1,2 (2,3 veces de expresión). El asterisco(*) indica genes que posteriormente se validaron por PCR a tiempo real.

El análisis del agrupamiento funcional de los 65 genes, obtenido mediante el programa informático dChip (www.hsph.harvard.edu/biostats/complab/dchip), demostraba la implicación de estos genes en ciclo celular, mitosis y replicación (fig 4.45.a). Además, un estudio más detallado dentro de las funciones del ciclo celular y mitosis, demostró que los genes principalmente participaban en la fase M del ciclo celular (fig 4.45.b). Entre los genes reprimidos hallamos genes que participan en la transición G2/M (CCNA, CCNB, WEE1, CDC25A, B, C), genes que participan en las distintas fases de la mitosis (MAD2L1, AURKA, KIF4A, CENPF/Mitosin) y en el punto de control de la anafase (BUB1 y BUB3). También hallamos genes importantes para la replicación del DNA (ORC-1(complejo de unión al origen de replicación), MCM-7 y DHFR) y para el transcurso de la fase S (CCNE y CDK2). El análisis de los genes inducidos reveló genes como; CCNG, v-Myb, MLLT11/AF1Q y Dineína.

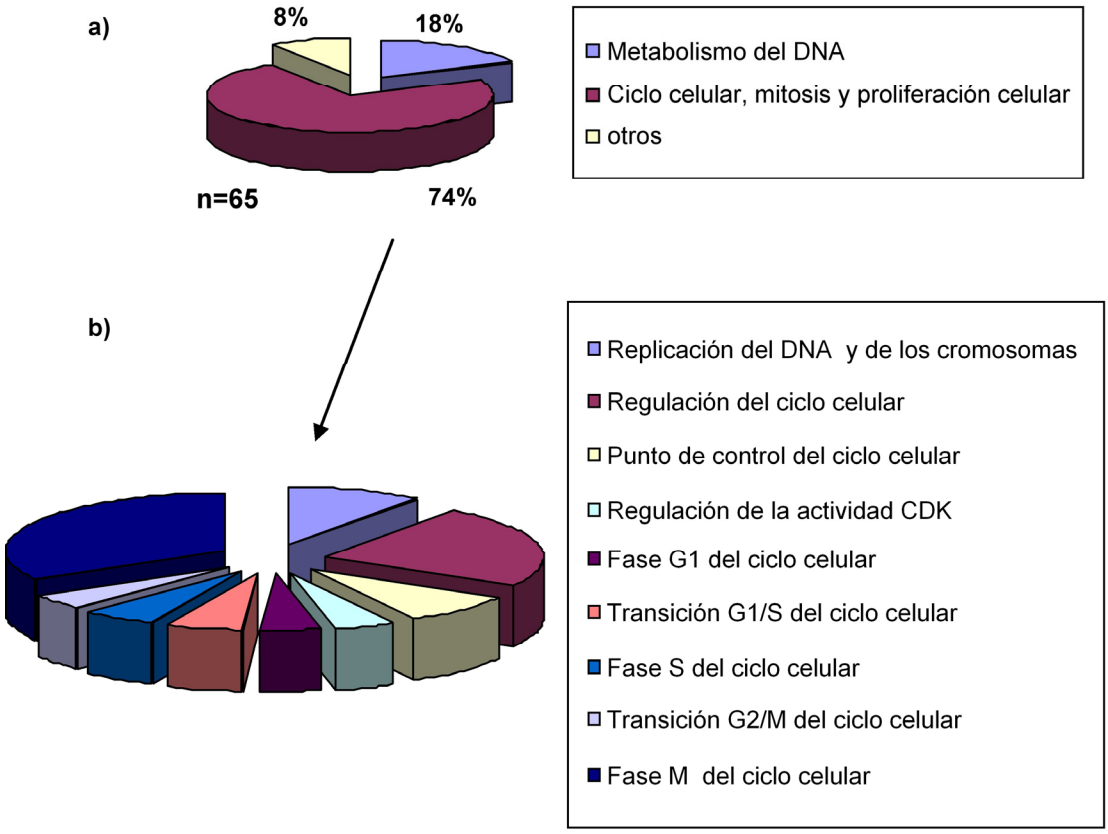


Fig 4.45 Agrupamiento funcional de los 65 genes cuya expresión estaba modificada por la expresión de p21. Las funciones indicadas aparecen representadas por un código de colores. a) Agrupamiento funcional de las tres principales funciones de los genes seleccionados. Los números adyacentes representan los porcentajes de representación con respecto al total de genes. b) Especificación desglosada de las funciones del ciclo celular, mitosis y proliferación celular.

4.2.3.2 Validaciones de la expresión génica.

Para confirmar los resultados de la hibridación de los microarrays, se validaron mediante northern blot o RT-PCR cuantitativa un total de 23 genes, 1 inducido y 22 reprimidos. Algunos de estos genes que aparecen regulados a las 12 h se encuentran en las tablas 4.2 y 4.3 y están marcados con un asterisco en la figura 4.44. Sin embargo, otros genes no aparecen en estas tablas porque su expresión se mantiene reprimida a 72 h de inducción de p21. El único gen inducido que estudiamos fue MLLT11, gen que se expresa de manera normal en las células progenitoras hematopoyéticas, pero sin embargo se expresa menos en las células diferenciadas de la sangre (Tse et al., 2004). Recientemente se ha demostrado su papel en metástasis en cáncer de mama (Li et al., 2006).

Las validaciones las realizamos en células Kp21 con 0, 3, 6, y 12 horas de tratamiento de Zn^{2+}. Por nothern blot se analizó la expresión de Cdc25A, Cdc25C y Cdc25B (fig 4.46) (fosfatasas que participan en la transición G2/M) y observamos una disminu ción en la expresión de estos genes a las 6 horas de inducción de p21.

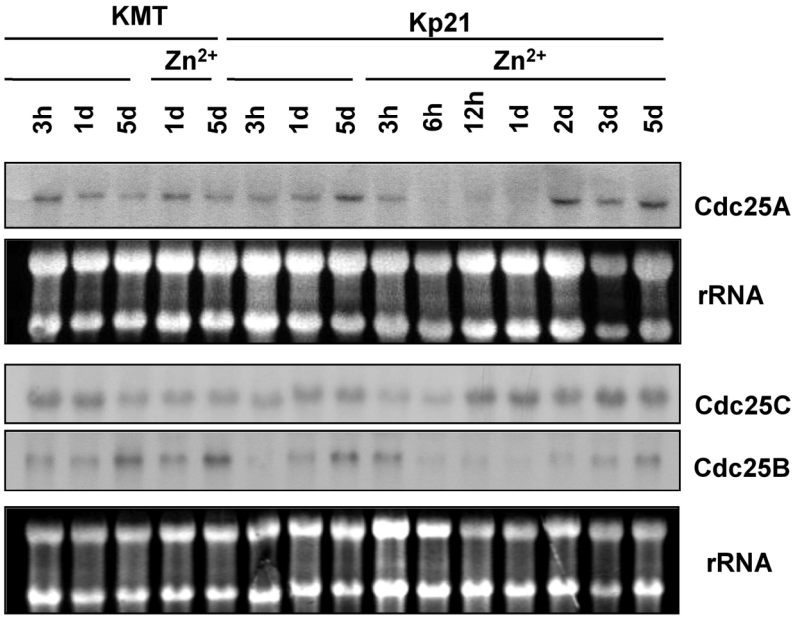
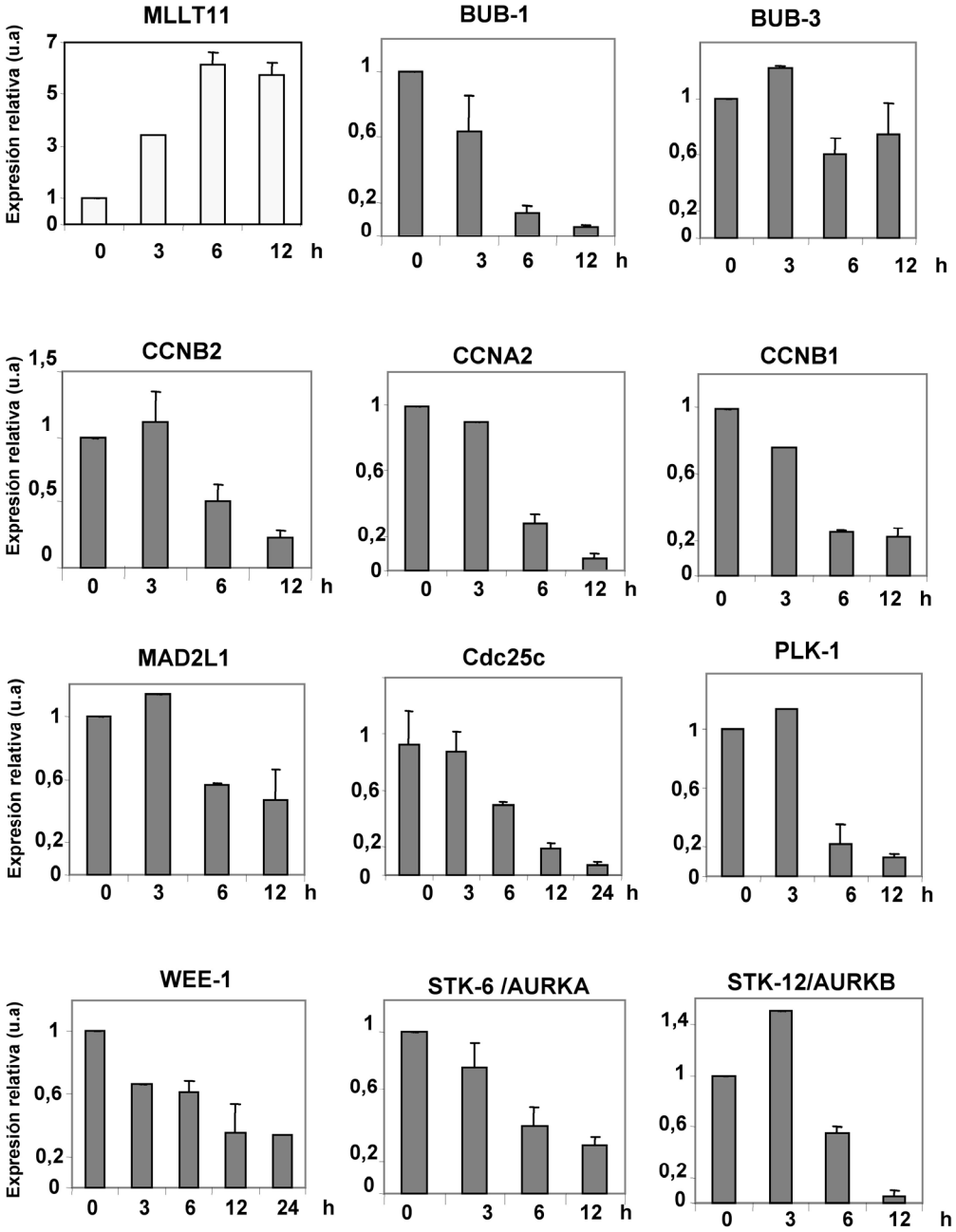


Fig 4.46 p21 regula la expresión de las fosfatasas Cdc25. Las células KMT y Kp21 se cultivaron en presencia de 75 µM ZnSO4 durante los tiempos indicados, se extrajo RNA total y la expresión de las fosfatasas Cdc25 (A, B, C) se analizó mediante Northern blot. Como control de carga y de integridad de los RNAs se muestra en los paneles inferiores de cada estudio una imagen de los rRNAs. (La hibridación de Cdc25A/B la realizó la Dra M.J. Muñoz).

El resto de los genes se validaron por RT-PCR (fig 4.47). En todos los casos confirmamos represión de los genes seleccionados, así como del gen escogido con expresión inducida (MLLT11). Estos efectos se observaron a un tiempo de 6 horas de inducción de p21, que coincide con el pico de máxima expresión de la proteína p21 (se alcanza entre las 3 -6 h y se mantiene hasta las 12 h).



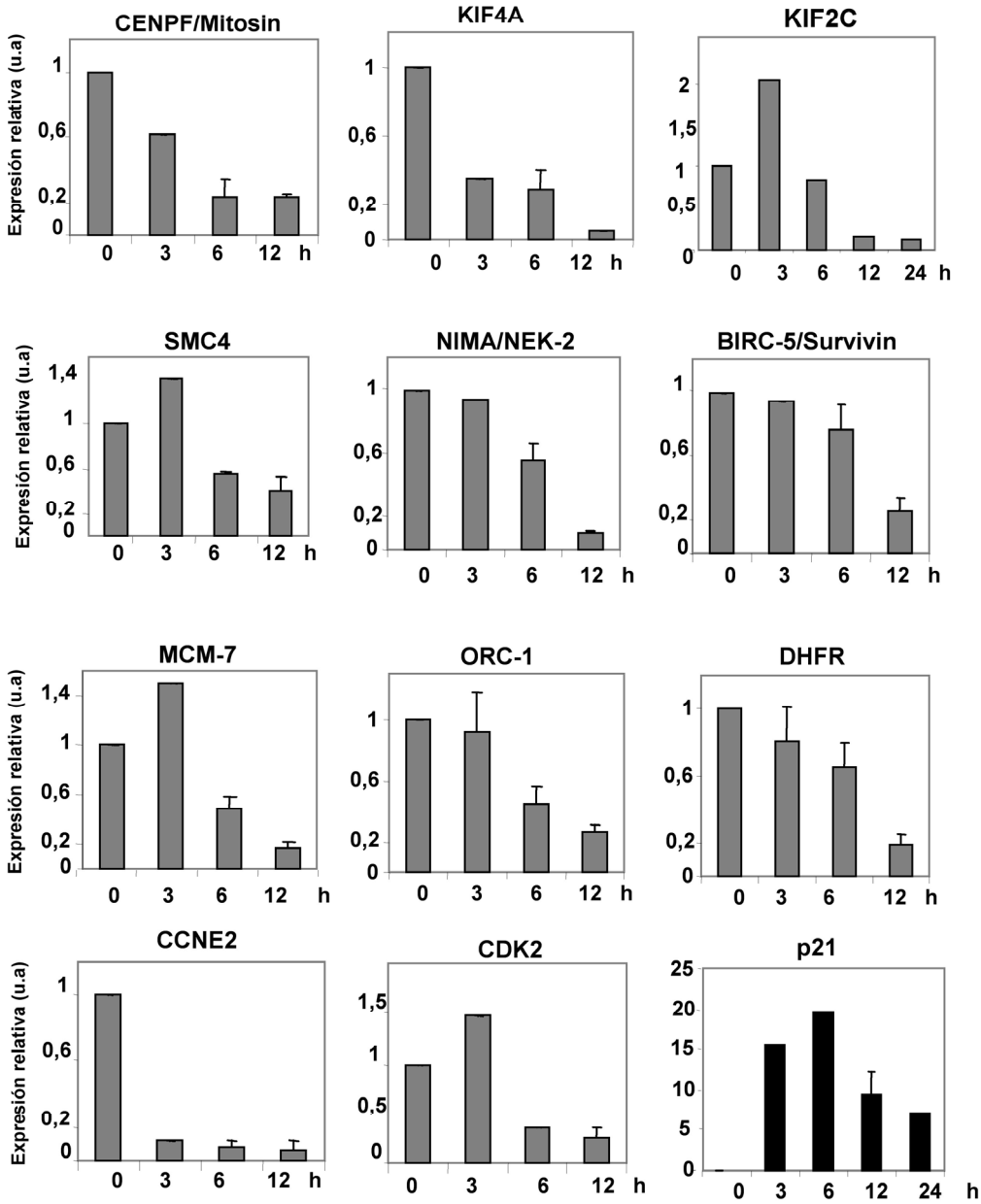
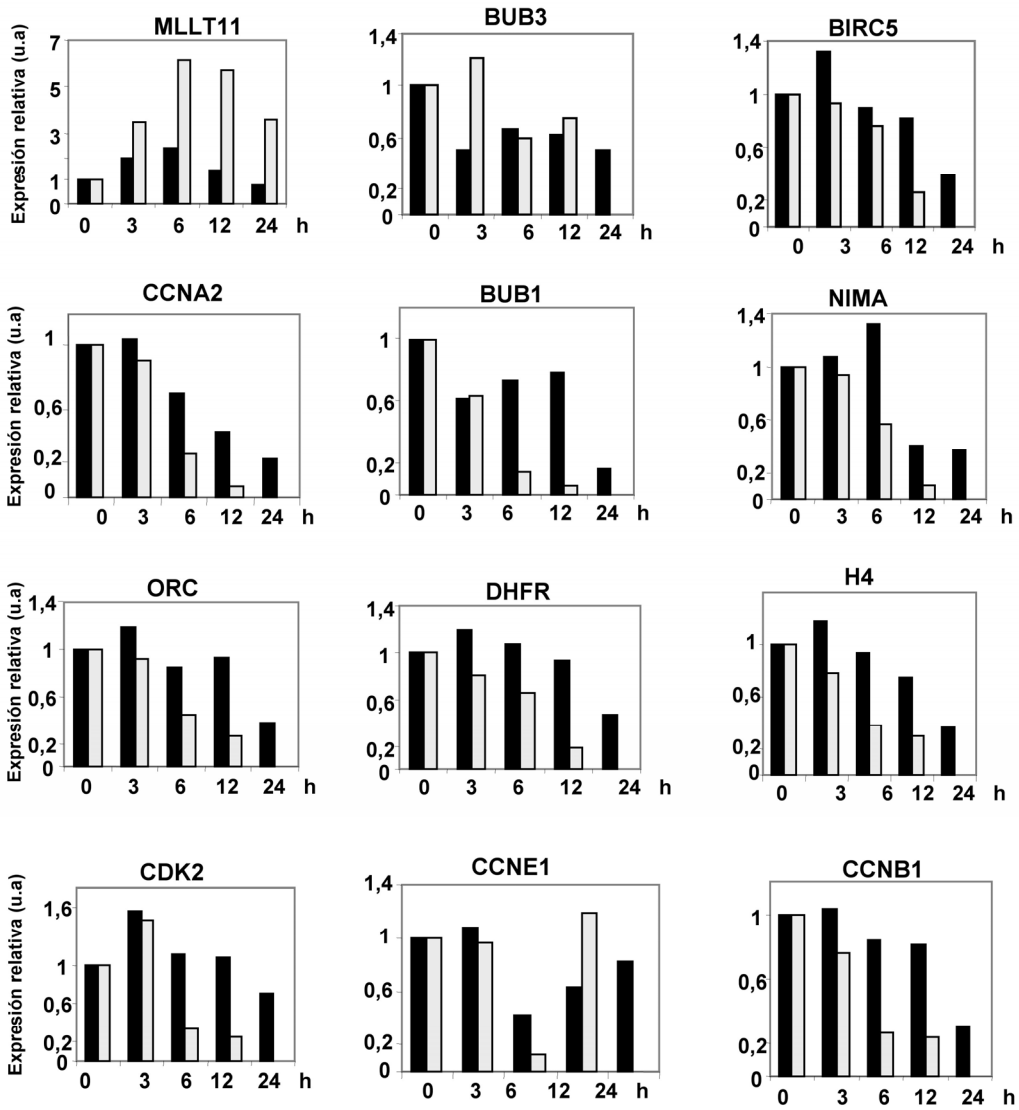


Fig 4.47 Validación de los genes regulados por p21. RT-PCRs cuantitativas de genes reguladores de ciclo celular, mitosis y replicación del DNA. En barras blancas inducidos por p21, barras grises genes reprimidos por p21 y barras negras control de inducción de p21. Los extractos de RNA pertenecen a células Kp21 tratadas con 75 µM $ZNSO_4$ durante 3, 6 , 12 y 24 h como se indica. Los datos representan la media de dos experimentos con distintos RNAs que los utilizados para hibridar los arrays. Los datos están normalizados para la expresión de la proteína ribosomal S14 en unidades arbitrarias (u.a), asignándose el valor unidad a la expresión relativa de cada gen en las células Kp21 sin tratar con Zn^{2+}. Las barras de error representan el SEM.

4.2.3.3 Comparación de la expresión génica regulada por p21 y p27

Para confirmar que los efectos observados en la expresión de los genes era debido principalmente a la inducción de p21, repetimos las RT-PCR en el modelo celular Kp27 tratando y sin tratar con Zn^{2+} (fig 4.48). Los resultados obtenidos mostraron que la inducción de p27, también reprimía genes reguladores de ciclo celular y mitosis, así como una inducción del gen MLLT11. Sin embargo, estos efectos eran en general menor y más tardíos, que los observados con la inducción de p21. Posiblemente, los resultados obtenidos tanto con p21 como con p27, sean consecuencia de un efecto directo de la parada de ciclo celular por ambos inhibidores para la mayoría de los genes.



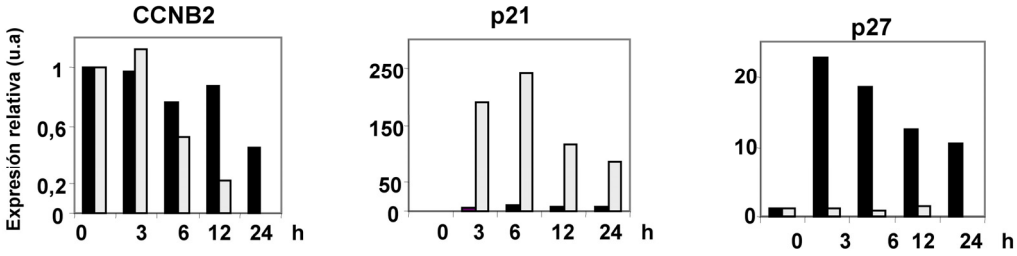


Fig 4.48 Comparación de la expresión génica regulada p21 y p27. RT-PCRs cuantitativas con oligos para genes reguladores de ciclo celular, mitosis y replicación del DNA. En barras grises genes regulados por p21 y barras negras genes regulados por p27. Los extractos de RNA pertenecen a células Kp21 y Kp27 tratadas con 75 µM $ZNSO_4$ durante 3, 6, 12 y 24 h como se indica. Los datos representan experimentos con distintos RNAs que los utilizados para hibridar los arrays. Los datos están normalizados para la expresión de la proteína ribosomal S14 en unidades arbitrarias (u.a), asignando el valor unidad a la expresión relativa de cada gen en las células Kp21 y Kp27 sin tratar con Zn^{2+}. Los datos de p21 y p27 están normalizados para la expresión de la proteína ribosomal S14 en unidades arbitrarias (u.a).

Sin embargo, en esta selección de genes hallamos 4 genes que eran reprimidos mucho antes y más marcadamente por p21 que por p27 (fig 4.49) Estos genes son; KIF4A (proteína que forma parte del motor de los microtúbulos), CENPF (proteína asociada a centrómero-cinetocoro), CCNE2 (ciclina asociada a CDK2) y WEE1 (quinasa que fosforila al complejo CDC2-ciclina B). Estos resultados obtenidos apuntaban la posibilidad de haber encontrado 4 posibles dianas tran scripcionales de p21.

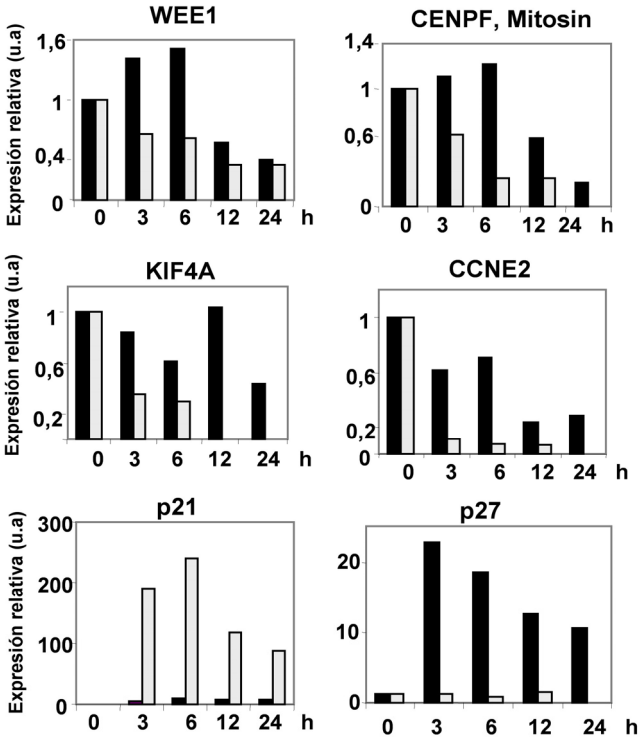


Fig 4.49 p21 reprime más severamente genes del ciclo celular y de mitosis. RT-PCRs cuantitativas de los genes KIF4A, WEE1, CENPF, CCNE2, p21 y p27. Los extractos de RNA de células Kp21 (barras grises) y Kp27 tratadas (barras negras) con 75 µM $ZNSO_4$ durante 3, 6, 12 y 24 h como se indica. Los datos representan experimentos con distintos RNAs que los utilizados para hibridar los arrays. Los datos están normalizados para la expresión de la proteína ribosomal S14 en unidades arbitrarias (u.a), asignando el valor unidad a la expresión relativa de cada gen en las células Kp21 y Kp27 sin tratar con Zn^{2+}. El estudio de p21 y p27 representan los controles de inducción de p21 y p27 en las líneas celulares Kp21 y Kp27. Los datos de expresión de p21 y p27, están normalizados para la expresión de la proteína ribosomal S14 en unidades arbitrarias (u.a)

4.2.4 Estudio de los dominios de p21 sobre sus efectos en represión génica.

Con el fin de esclarecer qué dominio de la proteína p21 era responsable de su actividad represora, se procedió a realizar un estudio con mutantes de p21 (generados y provistos por la Dra. Neus Agell, Universidad de Barcelona) (Fig 4.50). El mutante con dominio p21-NT sigue manteniendo la capacidad de unirse e inhibir a los complejos ciclina-CDKs. En cambio, el dominio p21-CT, sigue conservado su región de localización nuclear y su capacidad de unirse a PCNA.

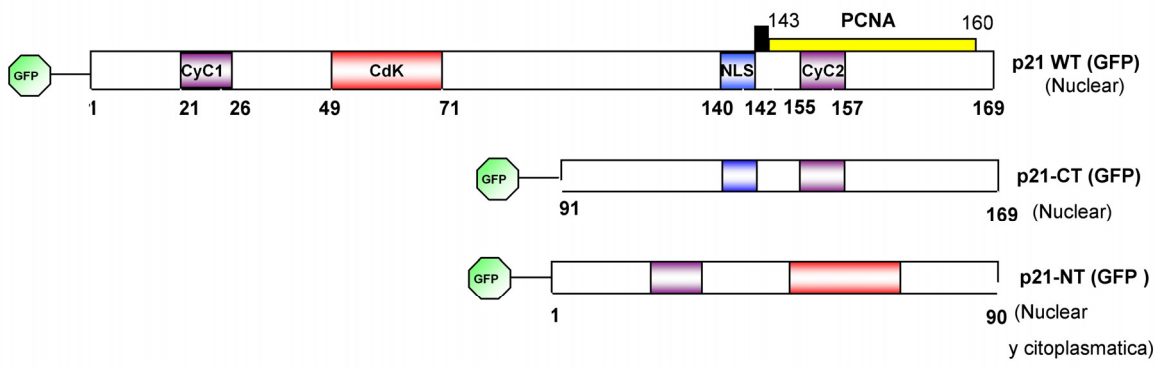


Fig 4.50 Esquema de la proteína de p21WT y de sus mutantes. Proteínas de fusión con "Green fluorescence protein". La proteína salvaje y p21-CT se localizan principalmente en el núcleo. La proteína p21-NT se localiza en núcleo y en citoplasma. Cyc1 y Cyc2 :sitios de unión a ciclina, CDK: sitio de unión de Cdk, NLS: señal de localización nuclear.

Este estudio lo realizamos transfectando transitoriamente cada uno de los mutantes de p21 en células K562. A continuación seleccionábamos las células positivas para la GFP mediante citometría de flujo con un FACSAria^{TM} (BD Biosciencies), de esta manera los resultados se realizaron solo sobre la población positiva para GFP.

A continuación, realizamos un análisis mediante RT-PCR de algunos de los genes validados en el aparatado 4.2.3.2. En la figura 4.51, podemos observar los resultados obtenidos para cada mutante en la expresión de tres genes seleccionados, dos de ellos eran reprimidos a 3 h de la inducción de p21. En todos los casos, observamos como la expresión de la proteína p21 salvaje (WT) es la más represora de todas. Además, los resultados demostraron que el dominio CT es esencial para la función represora de los genes CCNE2, WEE1 y KIF4A, mientras que el dominio NT mantiene su capacidad de

reprimir. Como control de nuestros experimentos analizamos los niveles de mRNA de GFP y p21.

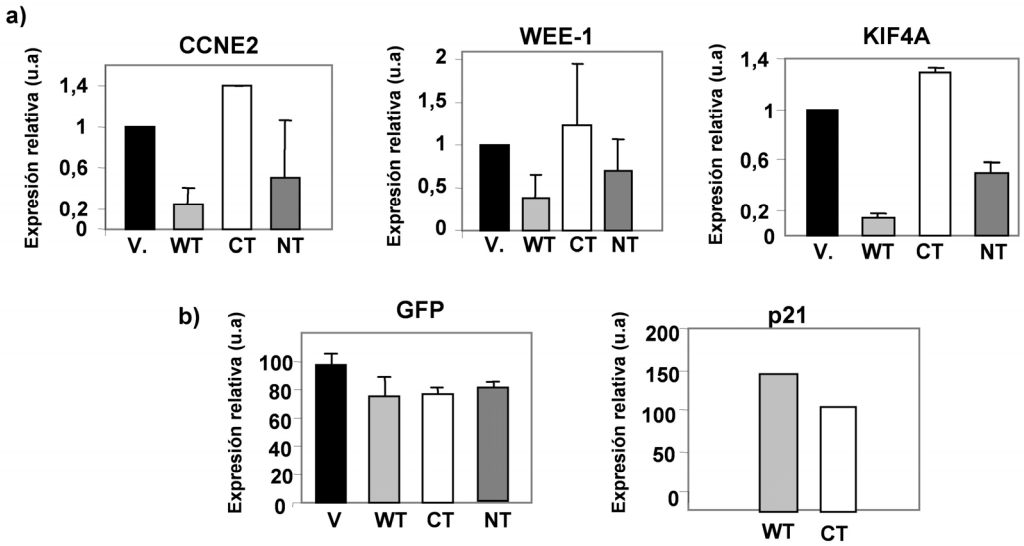


Fig 4.51 Estudio de la represión génica por p21WT y los mutantes de p21. Las células K562 fueron transfectadas con los plásmidos p21-WT-GFP (barras gris claro), p21-CT-GFP (barras blancas), p21-NT-GFP (barras gris oscuro) y el plásmido vector GFP (barras negras). Posteriormente las células positivas para GFP fueron seleccionadas por citometría de flujo. La expresión de los genes se analizó mediante RT-PCRs. a) Los datos de los genes CCNE2, WEE-1, KIF4A están normalizados para la expresión de la proteína ribosomal S14 en unidades arbitrarias (u.a), asignando el valor unidad a la expresión relativa de cada gen en las células K562 transfectadas con el plásmido control GFP. b) Estudio de la expresión de GFP y p21 como controles de transfección. Los datos están normalizados para la expresión de la proteína ribosomal S14 en unidades arbitrarias (u.a).

A la vista de los resultados obtenidos al analizar el transcriptoma de las células Kp21 y al realizar los experimentos en transitorio con mutantes, se puede concluir que p21 induce la represión de genes que controlan la progresión del ciclo celular, la mitosis y la replicación del DNA. Además, p21 podría estar actuando como co-represor transcripcional en al menos tres de los genes analizados. La represión de estos tres genes tiene lugar a 3 horas de la inducción de p21 y no con la inducción de p27. El resultado de transfecciones en transitorio confirma esta represión con la proteína p21 salvaje y con el mutante p21-NT. Este resultado sugiere la existencia de nuevos genes reprimidos por p21. Para confirmar esta hipótesis y elucidar el mecanismo de co-represión por p21, necesitaremos abordar un estudio más amplio posteriormente a este trabajo de Tesis.

4.3 Estudio de la expresión de p21, p27, p57 y c-Myc en muestras de cáncer colorectal (CCR).

Finalmente, como complemento de nuestro trabajo quisimos estudiar el papel de p21 en comparación con otros reguladores en muestras clínicas de cáncer colorectal. Para ello, analizamos la expresión de los reguladores de ciclo celular p21, p27, p57 y del oncogen c-Myc. El estudio se realizó analizando la expresión de estas proteínas en 20 pacientes con CCR (fig 4.52), estudiando muestra tumoral y de tejido sano de cada paciente. En todos ellos utilizamos como control de nuestros experimentos una parte de tejido sano de cada paciente. Todos los trabajos publicados hasta la fecha sobre los niveles de p21 en CCR, se han hecho a nivel de RNA por RT-PCR o de proteína por inmunohistoquímica. Dada la potente regulación post-transcripcional de p21 y la dificultad para cuantificar la señal por inmunohistoquímica, iniciamos un estudio por western blot.

De los 20 pacientes, el 25 % mostraron una expresión de p21 mayor en el tejido tumorogénico, sin existir una correlación con el estadío de la enfermedad. El 20 % de los pacientes, manifestó una disminución en la expresión de p21 respecto al tejido sano, de ellos la mitad se encontraban en estadio IV y la otra mitad en estadio II. El resto de los pacientes (55 %), no mostraron variaciones en la expresión de p21, pero si existe una correlación con el estadio, ya que se encontraban en el estadio III o IV. Los resultados obtenidos, sugieren que los cambios de expresión de p21 no son indicativos del transcurso del cáncer colorectal, aunque no son muchos los casos estudiados y se requiere un estudio futuro más amplio.

El estudio llevado a cabo sobre p27, demostró que el 30% de los pacientes presentaban un aumento en la expresión que se correlacionaba con los estadios I y II de la enfermedad. El 40 % de los pacientes mostraba un descenso en la expresión correlacionado con los estadios III y IV. El resto de los pacientes (30 %), no mostraron variaciones en la expresión de p27, pero todos se hallaban en el estadio II de la enfermedad. Estos datos nos sugieren que a medida que avanza la enfermedad, se observa una disminución en la expresión de p27. Por lo tanto, la expresión de p27 en CCR al igual que en otros cánceres, es un buen indicador de la progresión de la enfermedad. Una disminución en su expresión se correlaciona con peor pronóstico.

El estudio realizado sobre c-Myc, nos mostró que principalmente, la disminución de la expresión se correlaciona con los pacientes en estadio IV.

El estudio realizado sobre p57, revelo datos pocos significativos en cuanto a la expresión de p57 y al estadio de la enfermedad.

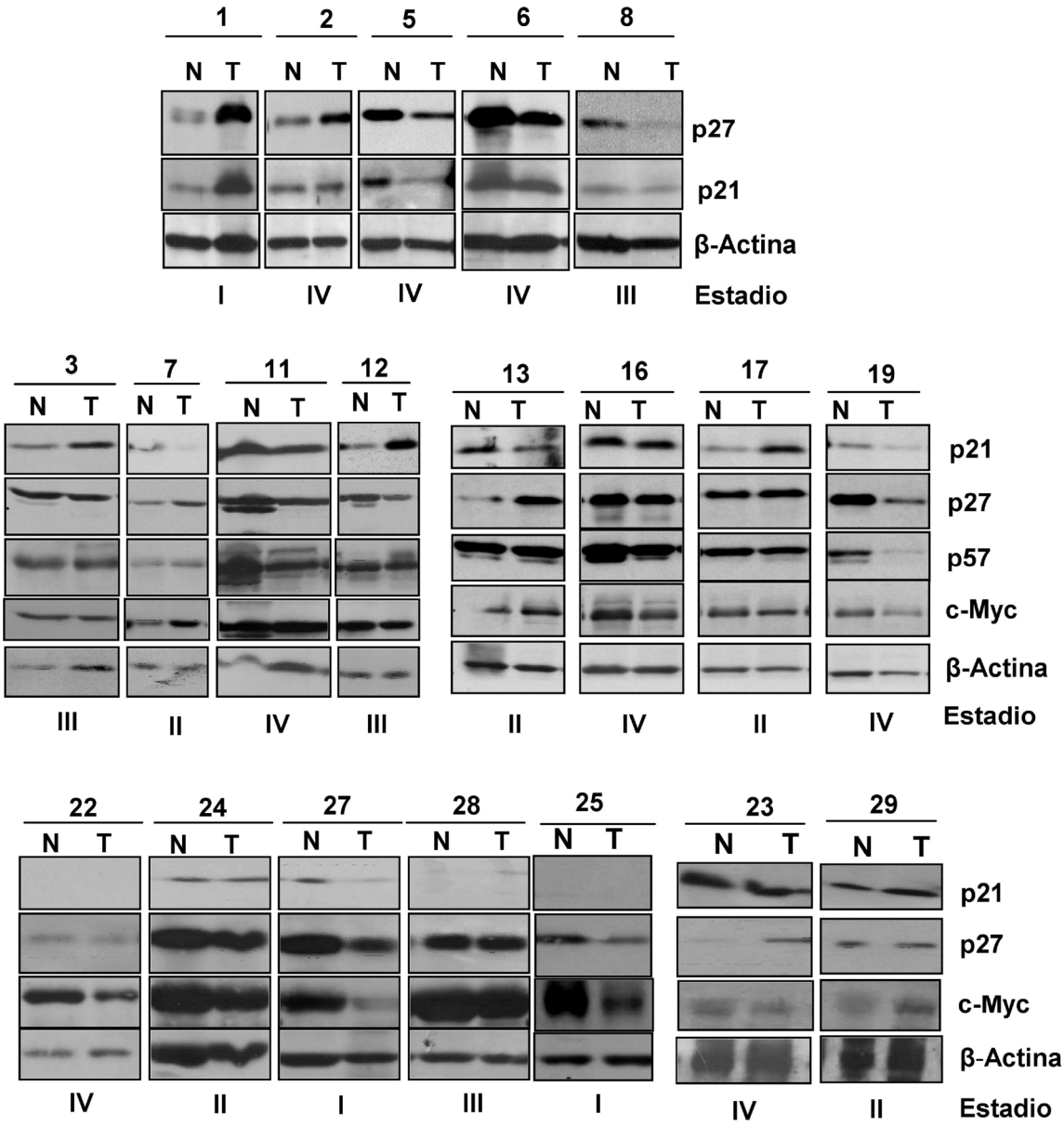


Fig 4.52. Expresión de p21, p27,p57 y c-Myc en pacientes con CCR. Western blot con anticuerpos anti-p21, -p27, -p57, -c-Myc de lisados de proteína total de 20 muestras de tumores de colon (T) y tejido sano adyacente (N). Como control de cantidad se analiza la expresión de β-Actina. Los estadios de la enfermedad se indica en la parte inferior de cada western blot.

Aunque el número de muestras no permita un análisis estadistico, como primera aproximación, podemos concluir que los niveles de p21 no aportan información sobre el transcurso de la enfermedad. Sin embargo, los niveles de p27 se correlacionan con el estadio y con un peor pronóstico. Cabe señalar, que este estudio es preliminar y se prevé ampliarlo con un número superior de pacientes, para poder alcanzar resultados más concluyentes.

5.~ DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1 Papel dual de p21 en apoptosis.

El inhibidor de complejos Cdk-ciclina p21, es responsable de la parada de ciclo celular por vías tanto dependientes o como independientes de p53. Esta parada de ciclo celular permite a las células reparar el daño genotóxico sufrido y continuar con la división celular. p21, al igual que otras proteínas como Myc y E2F, presenta dualidad antagónica. Por una parte, la función de inhibir el ciclo celular y reparar el daño sufrido, contribuye a su papel como supresor de tumores. Por otra parte, la capacidad de p21 de inducir parada del ciclo celular después del estrés celular protege a la célula de la apoptosis. Esta actividad le confiere potencial de actuar como un oncogén (revisado en Gartel and Tyner, 2002).

Los fármacos utilizados en cáncer, inducen apoptosis por vías dependientes o independientes de p53, y en varios modelos la proteína p21 protege a las células de esta apoptosis. Esta conclusión se ha extraído de estudios, donde delecciones de p21 incrementan la sensibilidad de las células tumorales a la apoptosis inducida por diferentes agentes quimioterapéuticos. Uno de los modelos celulares donde más se ha estudiado el papel de p21 en apoptosis es en el modelo de cáncer colorectal HCT116p21$^{-/-}$, donde p21 está mutado por recombinación homóloga (Waldman et al., 1995). En este modelo se ha atribuido un papel anti-apoptótico de p21 respuesta a distintos agentes;

- fármacos genotóxicos que causan daño al DNA: adriamicina, daunomicina, etopósido y 5-fluoracilo (Bunz et al., 1998; Bunz et al., 1999; Chan et al., 2000; Chattopadhyay et al., 2001; Javelaud and Besancon, 2002; Le et al., 2005; Mahyar-Roemer and Roemer, 2001; Ravizza et al., 2004; Seoane et al., 2002; Sturm et al., 2006). La apoptosis en estos casos puede ser dependiente e independiente de p53.

- inhibidores de la formación de microtúbulos: paclitaxel y vincristina (Giannakakou et al., 2001; Stewart et al., 1999). En la mayor parte de los casos es apoptosis dependiente de p53.

- inhibidores de la topoisomera I: como la camptotecina (Furuta et al., 2006; Han et al., 2002). Es una apoptosis independiente de p53.

- inhibidores de la histona deacetilasa: n-butirato (Archer et al., 1998; Mahyar-Roemer and Roemer, 2001; Wagner and Roemer, 2005). Es una apoptosis independiente de p53.

- hiperoxia celular (Helt et al., 2001; Staversky et al., 2006). Es una apoptosis dependiente de p53.

- irradiación (Bunz et al., 1998; Jung et al., 2003; Sohn et al., 2006; Sturm et al., 2006; Wendt et al., 2006). Es una apoptosis dependiente e independiente de p53.

- inhibidores de la ciclo-oxigeneasa-2 (COX2): curcumina y SC-560 (Jaiswal et al., 2002; Lee et al., 2006). Es una apoptosis independiente de p53.

Sin embargo, también se ha observado en este modelo celular que compuestos quimio-preventivos como el resveratrol inducen apoptosis independiente de p53 y p21 (fig 5.1).

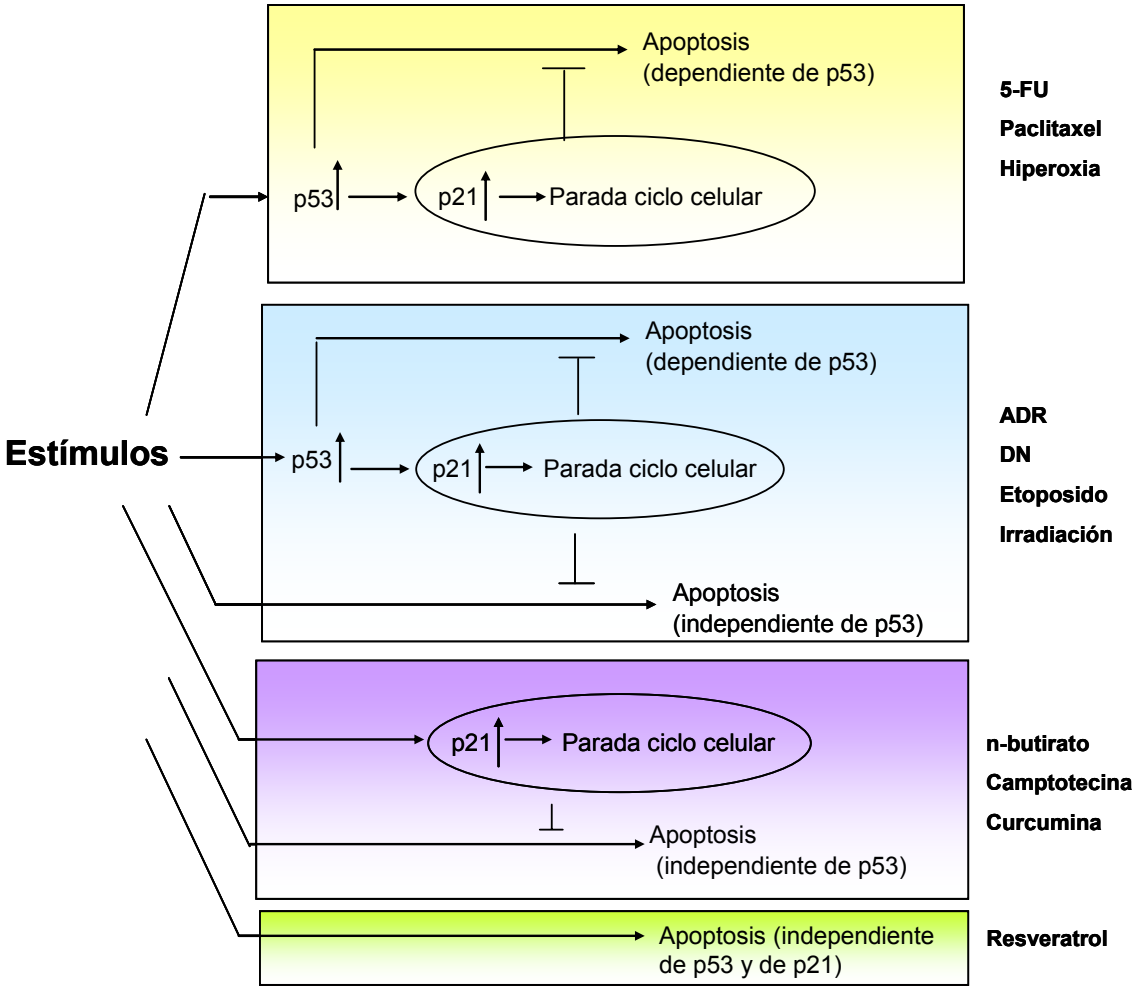


Fig 5.1 Esquema de diferentes respuestas de las células HCT116 a quimioterápicos y agentes naturales quimio-preventivos (figura modificada de Mahyar-Roemer M et al ., 2001).

Por otra parte, el modelo celular HCT116p21$^{-/-}$ también ha servido para demostrar el papel pro-apoptótico de p21 con diferentes compuestos;

- desestabilizadores del ensamblaje de microtúbulos: noscapina (Aneja et al., 2007).
- inhibidores de la timidilato sintetasa: tomudex y raltitrexed (Geller et al., 2004).
- la sobre-expresión de la proteína RAD50, proteína involucrada en la reparación del DNA (Shin et al., 2001).
- antioxidantes: vitamina E y PDTC (pyrrolidine dithiocarbamate) (Chinery et al., 1997).

5.2. ¿Tiene p21 un papel protector de la apoptosis en células de cáncer colorectal?

En este trabajo de Tesis se utilizó el modelo de cáncer colorectal HCT116 y las sublíneas con deficiencia de p53 (HCT116p53$^{-/-}$) o p21 (HCT116p21$^{-/-}$), con el fin de determinar los efectos de dichos genes en respuesta a un fármaco cuyo mecanismo de acción no implica daño genómico. Se eligió como modelo el inhibidor de quinasas imatinib. Un trabajo previo realizado en este modelo celular (HCT116), sugirió al receptor tirosina-quinasa c-Kit como diana terapéutica de imatinib en células HCT116 (Attoub et al., 2002). Sin embargo, en contraste con los resultados mostrados en ese trabajo, nosotros no hemos detectado en las células HCT116 expresión de c-Kit.

Imatinib no es genotóxico (no detectamos γH2AX), sin embargo su efecto anti-proliferativo y citotóxico era más agresivo en HCT116p21$^{-/-}$ que en células parentales. Este mismo resultado lo obtuvimos con otro inhibidor tirosina-quinasas como es gefitinib. La sensibilidad de esta sublínea celular también ha sido puesta de manifiesto con otros fármacos o estímulos como adriamicina, daunomicina, 5-FU, n-butirato, etopósido e hiperoxia (citados anteriormente). Los resultados obtenidos con estos estímulos, nos llevaron a realizar un abordaje más amplio sobre el papel de p21 en apoptosis y sobre el posible papel protector de p21 con fármacos inhibidores tirosina-quinasa. Sin embargo, obtuvimos el sorprendente e interesante resultado de que la hiper-sensibilidad de la línea HCT116p21$^{-/-}$ a fármacos de mecanismos de acción tan diferentes como imatinib, adriamicina y 5-FU (y por tanto, posiblemente a otros fármacos) no es debida a la ausencia de p21, contradiciendo los informes anteriores de que p21 es un inhibidor de apoptosis en este modelo. Los resultados que nos llevaron a esta conclusión son:

a) Modelo HCT116Myc-ER; El aumento de expresión de Myc induce una represión en los niveles de expresión de p21. Sin embargo, la sublínea celular HCT116WTMyc-ER no presenta mayor sensibilidad a imatinib ni a adriamicina, a diferencia de lo observado por otro grupo en presencia de adriamicina (Seoane et al., 2002) (fármaco que induce apoptosis por mecanismos dependientes e independientes de p53). El aumento de expresión de Myc tampoco induce cambios en la sensibilidad de las células HCT116p21$^{-/-}$Myc-ER con imatinib.

b) Modelo HKO-MTp21; La expresión ectópica condicional de p21 en las células HCT116p21$^{-/-}$ no disminuye la hiper-sensibilidad de estas células a imatinib ni a adriamicina (fig 4.18 y fig 4.21). Este resultado es contradictorio al obtenido por otro grupo, donde recuperaban los niveles de expresión de p21 mediante adenovirus y observaban una menor apoptosis con n-butirato (presenta un mecanismo independiente de p53) (Mahyar-Roemer and Roemer, 2001).

c) Modelo HCT-shp21; El silenciamiento de la expresión de p21 mediante RNA de interferencia en la sublínea HCT116WT, no incrementaba la sensibilidad a inhibidores tirosina-quinasa (imatinib y gefitinib) o a fármacos genotóxicos (Adriamicina y 5-FU).

Los resultados obtenidos en esta Tesis con las células HCT116 son consistentes con los datos obtenidos in vivo. La apoptosis observada por azoximetano en las células de las criptas intestinales está abolida en ratones con deficiencia para p21 (Poole et al., 2004a). Además, estos ratones presentan una mayor incidencia en tumores colorectales en cooperación con la deficiencia en APC (Yang et al., 2001a; Yang et al., 2001b) o en Muc2 (Yang et al., 2005). Estos resultados no son los esperables si la deficiencia de p21 tuviera un potente efecto pro-apoptótico en células intestinales.

5.3 ¿A qué se debe la hipersensibilidad a la apoptosis de las células HCT116p21$^{-/-}$?

Las células HCT116p21$^{-/-}$ presentan una serie de características, más allá de la ausencia de p21, que difieren de las células parentales. En este trabajo hemos demostrado que estas células presentan una activación constitutiva de quinasas relacionadas con supervivencia celular y procesos anti-apoptóticos como son AKT, ERK1/2 y c-SRC. Esta activación disminuye a medida que estas células entran en apoptosis mediada por imatinib. Además, también hemos observado un aumento de expresión de proteínas reguladoras de la apoptosis como son Bcl-2 y dianas

transcripcionales de p53. Es en esta última proteína, donde se ha centrado nuestro estudio. Nuestros datos confirman que las células mutadas en p21 presentan mayor expresión (fig 4.24) y actividad de p53 (fig 4.26), lo que conlleva una proteína más estable y activa (presenta modificaciones postraduccionales que aumentan la estabilidad de la proteína y la unión a DNA).

Cabe señalar, que este aumento de expresión de p53 en las células HCT116p21$^{-/-}$, junto con un desequilibrio en los reguladores de apoptotsis Bax/Bcl-2 ha sido observado anteriormente por otros grupos (Aneja et al., 2007; Broude et al., 2007; Giannakakou et al., 2001; Javelaud and Besancon, 2002; Sohn et al., 2006). Este fenómeno tiene lugar a nivel post-traduccional. Algunos trabajos han explicado este efecto por la ausencia de p21 (Blagosklonny, 1997; Broude et al., 2007) o por un incremento en la expresión de p14^{ARF} que aumentaría la estabilidad de p53, tras reprimir la expresión del principal regulador negativo de p53, MDM2 (Javelaud and Besancon, 2002). Sin embargo, en nuestro trabajo hemos observado que una disminución en la expresión de p21 en células parentales (HCT-shp21) o una recuperación en la expresión de p21 en células HCT116p21$^{-/-}$ (HCT-MTp21 o HCT-adp21) no producía variación de los niveles de expresión p53 (fig 4.30). Por lo que la ausencia de p21 no parece responsable de la mayor actividad de p53. Además, hallamos bajos niveles de expresión de p14^{ARF} y no encontramos cambios de expresión de este gen (a nivel de mRNA) entre células parentales y células HCT116p21$^{-/-}$ (dato no mostrado). Este resultado, coincide con el de otros grupos que también confirman la ausencia en la expresión de p14^{ARF} en el modelo celular HCT116 (Broude et al., 2007; Chattopadhyay et al., 2001; Hemmati et al., 2005; Mitra et al., 1999; Yang et al., 2000a). Asimismo, las células HCT116p21$^{-/-}$ presentan mayor expresión de MDM2, lo que sería explicado por los altos niveles de p53 pero serían datos contradictorios al obtenido por Javelaud et al., (2002) que observa una represión en los niveles de expresión de MDM2. No obstante, nuestros datos coinciden con un trabajo publicado muy recientemente (Broude et al., 2007), donde observan altos niveles de p53 y MDM2 en células HCT116p21$^{-/-}$. Sin embargo, este trabajo describe a p21 como un regulador negativo de la estabilidad de p53 y donde MDM2 no actúa como su principal regulador, a diferencia de lo que si ocurre en las células parentales. Nuestro trabajo de Tesis, ha demostrado que p21 no actúa como un regulador de p53, puesto que cambios de expresión de p21 en células parentales (HCT-shp21) o la recuperación del expresión de p21 en células HCT116p21$^{-/-}$ (HKO-MTp21 y HKOAd-p21) no modifican la expresión de p53.

El aumento de actividad y expresión de p53 en el modelo celular HCT116p21$^{-/-}$ es probablemente consecuencia de las modificaciones postraduccionales. Sin embargo, la elevada actividad de las enzimas modificadoras de p53 en estas células es un hecho que no podemos explicar. La hipótesis más plausible es que durante el proceso de selección de la línea HCT116p21$^{-/-}$ (que implica largos periodos en cultivo con antibióticos de selección) se haya seleccionado un subclon que presenta respecto a las células parentales otros cambios genéticos además de la mutación en p21.

Independientemente de los mecanismos responsables de la elevada estabilidad y niveles de p53, nuestro datos demuestran que el aumento de actividad de p53, es al menos parcialmente, responsable de la hipersensibilidad de las células HCT1116p21$^{-/-}$, puesto que la supresión de p53 (shp53) o la inactivación (DDp53) de p53, revierte el fenotipo hipersensible de las células a fármacos genotóxicos como ADR y fármacos inhibidores de tirosina-quinasas como imatinib (fig 4.33). La menor sensibilidad observada con adriamicina, está en concordancia con los datos que demuestran una apoptosis inducida por mecanismos dependientes de p53. (Bunz et al., 1998; Bunz et al., 1999). A su vez, la menor sensibilidad observada con imatinib, confirmaría que este fármaco induce apoptosis por un mecanismo dependiente de p53 en este modelo celular. Esta hipótesis además queda reforzada por el hecho haber observado una mayor sensibilidad en células parentales (HCT116WT) respecto a células deficientes en p53 (HCT116p53$^{-/-}$) (fig 4.34).

Los principales resultados obtenidos en relación con los niveles de p21 y p53 y su asociación con la susceptibilidad a fármacos se esquematizan en la tabla 5.1

Línea	p21	p53	Sensibilidad
HCT116WT	++	+	++
HCT-shp21*	+	+	++
HCT116WTMyc-ER(+4OHT)*	+	+	++
HCT116-p21$^{-/-}$	-	++++	++++
HKO-MTp21(+Zn^{2+})*	++	++++	++++
HKO-shp53*	-	+	++
HKO-DDp53*	-	+	++
HCT116p53$^{-/-}$	++	-	+
HCT116p53$^{-/-}$Myc-ER(+4OHT)*	+	-	+

Tabla 5.1 Esquema de los resultados obtenidos con las líneas celulares usadas en esta Tesis. Se resumen el nivel de expresión de p53 y p21 con la sensibilidad a fármacos (imatinib y adriamicina). Los asteriscos indican las líneas celulares derivadas de una misma línea parental. Se observa cómo la mayor sensibilidad se asocia sólo con niveles altos de p53 y no con la ausencia de p21.

En resumen, se pueden extraer dos conclusiones: 1) la apoptosis observada en células deficientes en p21 no es consecuencia del papel protector de p21, y 2) los niveles de p53 determinan la mayor apoptosis observada. Esta última conclusión, coincide con los datos obtenidos de fibroblastos murinos super-p53/p21$^{-/-}$ o super-p53 (que presentan uno o dos transgenes silvestres, además de los dos alelos endógenos p53) respecto a fibroblastos murinos p21$^{-/-}$, en respuesta a daño genotóxico por adriamicina (Efeyan et al., 2007). En estas células la ausencia de p21 impide la parada del ciclo celular. Sin embargo, la apoptosis aumenta a medida que aumentan los niveles de p53 y es independiente de los niveles de p21 (De la Cueva et al., 2006; Efeyan et al., 2007).

Por lo tanto, los resultados publicados en relación al papel de la proteína p21 como protector de apoptosis, basados en la línea celular HCT116p21$^{-/-}$ y mencionados anteriormente (ver apartado 5.1), deberían de ser reconsiderados. Nuestro trabajo indica que las células HCT116p21$^{-/-}$ crecen más despacio que las parentales, muestran una tasa espontánea de apoptosis y son mucho más sensibles a todos los estímulos apoptóticos. Los niveles basales altos de p53 reflejarían una permanente situación de estrés para esta línea celular. No obstante, en este trabajo hemos obtenido datos en un modelo de leucemia mieloide crónica (K562) en los que se ha demostrado un papel protector de apoptosis y que concuerda con los datos obtenidos en otros modelos celulares diferentes a HCT116p21$^{-/-}$. Algunos de estos modelos celulares son: 1) células de cáncer de mama (MCF-7) en repuesta a prostanglandina (A2), aumentan los niveles de expresión de p21 y sufren parada en G1 (Gorospe et al., 1996), 2) células de macrófagos (RAW 264.7), donde la expresión de p21 ha sido atenuada mediante nucleótidos antisentido, presentan un aumento de la apoptosis inducido por oxido nítrico (Yang et al., 2000b), 3) células procedentes de leucemia linfoblástica T (Jurkat), con una sobre-expresión de p21 aumenta el porcentaje de células paradas en G2/M y atenúa la apoptosis inducida por paclitaxel (Ahmed et al., 2004) y 4) modelos animales de linfomagénesis, donde p21 presenta un papel anti-apoptótico en linfomas de ratones deficientes en p53 (De la Cueva et al., 2006).

5.4 p21 protege a las células K562 de la apoptosis por imatinib

En este trabajo hemos estudiado el papel protector de p21 sobre la apoptosis inducida por imatinib en leucemia mieloide crónica. Para ello, hemos escogimos el modelo celular K562 porqué: 1) expresa Bcr-Abl (producto de la translocación

cromosómica t(9,22) (Collins et al., 1987)) la principal diana terapéutica de imatinib (Gambacorti-Passerini et al., 1997), 2) no expresa p53 y la expresión de p21 es independiente de p53 (Law et al., 1993), 3) disponíamos del modelo celular Kp21 con expresión ectópica condicional de p21 (Munoz-Alonso et al., 2005).

En nuestro trabajo hemos demostrado que la expresión condicional de p21, reduce la apoptosis inducida por imatinib en células K562, por tanto de manera independiente de p53 (fig 4.36). Este resultado es opuesto al observado en el modelo celular HCT116p21$^{-/-}$ con expresión condicional de p21 y con sobre-expresión de p53 y donde la menor sensibilidad observada fue en células deficientes en p53 (HCT116p53$^{-/-}$). Sin embargo, cabe señalar que las células de CCR no presentan una diana terapéutica al imatinib tan específica como es la quinasa Bcr-Abl en K562, lo que es consistente con los efectos anti-proliferativos observados del imatinib en el modelo HCT116 a dosis mayores de las observadas en el modelo K562.

En resumen, en este trabajo hemos demostrado que p21 presenta un papel protector frente a la apoptosis inducida por imatinib en el modelo celular K562.

5.5 Comparación de la regulación genica inducida por p21 y p27.

En los últimos años se ha discutido mucho sobre un aspecto muy importante, que dotaría a la proteína p21 de una función como regulador específico de la expresión de genes. La sugerencia de que p21 pueda regular la transcripción es obvia, p21 inhibe la actividad quinasa de complejos Cdk-ciclina y estos a su vez, regulan la actividad de numerosos factores de transcripción. Los ejemplos más conocidos, son los genes regulados transcripcionalmente por los miembros de la familia E2F/Rb (Dotto, 2000) y NF-kB (Poole et al., 2004b). Asimismo también se ha observado su papel como cofactor transcripcional independientemente de su unión a complejos Cdks, regulando la actividad de otras proteínas que también se une al DNA como es el caso, STAT3 (Coqueret and Gascan, 2000), Myc (Kitaura et al., 2000), c/EBP (Harris et al., 2001) y el receptor de estrógenos (Fritah et al., 2005). Además, p21 interacciona con la histona acetilasa CBP y p300 (Snowden et al., 2000), sugiriendo que p21 funciona como un regulador de los promotores dependientes de CBP, a través de modular la actividad de la histona acetilasa, o bien por contacto con la RNA polimerasa II. Más recientemente, se ha descrito su papel como represor transcripcional sobre Wnt4 (Devgan et al., 2005), Myc y

Cdc25A (Vigneron et al., 2006). Esta represión la realiza p21 tras asociarse con E2F y STAT3 en los promotores de estos genes.

Para profundizar en el papel p21 como posible regulador transcripcional, utilizamos el modelo celular Kp21 (expresión ectópica condicional de p21 en células K562) donde observamos los genes regulados por p21 a tiempos cortos (12 h) y largos (72 h) de expresión de p21, mediante la tecnología del microarray (fig 4.40). Además, teníamos la oportunidad en este estudio de excluir aquellos genes que eran regulados por p27 (otro inhibidor de complejos Cdks y miembro de la familia Cip/Kip), porque disponíamos de un modelo singénico de expresión ectópica condicional de p27 (Kp27).

Un trabajo anterior publicado por nuestro laboratorio, describía el papel de p21 como inductor de la diferenciación megacariotíca, que se hacía más evidente cuando las células estaban expuestas a tiempos largos de inducción de p21 (72 h), mientras que la expresión a tiempos largos de p27 inducía diferenciación eritroide (Munoz-Alonso et al., 2005). Por lo tanto, nuestro objetivo se centró en estudiar los efectos de p21 a tiempos cortos (12 h) con el fin de identificar genes que fuesen objeto de represión por p21. Para ello realizamos un análisis muy restrictivo, donde se eligió un nivel de variación mínimo de 5 veces ($\log_2$ 2,3) como criterio de selección de genes para nuestro análisis. Con este análisis, pretendíamos identificar genes candidatos a ser dianas “directas” de la co-represión transcripcional por p21. Hallamos tan sólo 70 genes, donde el 94 % eran reprimidos y el 6 % eran inducidos (fig 4.43). Nuestros datos apuntaban firmemente al papel de p21 en ciclo celular y mitosis (70 % de los genes), datos que también fueron confirmados con el programa de ontología e interacciones moleculares “Ingenuity System“(fig 4.42). Una vez obtuvimos estos datos, relajamos las condiciones restrictivas del análisis, eligiendo como criterio de selección un nivel de variación mínimo de al menos 2,3 veces ($\log_2$ 1,2). Por otra parte este criterio, el más frecuentemente utilizado en los análisis de expresión de “microarray” y, en concreto, el utilizado en un estudio con células humanas de fibrosarcoma (HT1080) con expresión inducible de p21 y donde estudiaron los genes que cambian tras inducción de p21 durante 72 h (Chang et al., 2000b). La aplicación de programas de “clustering” identificó correctamente los perfiles de expresión dependiendo de si expresan o no p21 y en función del tiempo de expresión de p21 (fig 4.40). En nuestro modelo y con el criterio de 2,3 veces elegido, encontramos que p21 (12 h de inducción) regula 388 genes, de un conjunto de 14953 genes diferentes, lo que supone que en estas condiciones p21 participa en la regulación del 2,5 % del genoma de la célula. El agrupamiento funcional, agrupó a los genes modificados por p21

principalmente en dos grupos: a) crecimiento celular y/o mantenimiento celular (35 %) y b) ciclo celular y mitosis (32 %). Sin embargo, es esperable que la gran mayoría de estas regulaciones sea consecuencia indirecta de la parada proliferativa que impone p21 y no reflejan si es un efecto directo de p21 o bien, un efecto secundario de su papel como inhibidor de complejos Cdks.

A la luz del análisis del transcriptoma de nuestro modelo celular, se observa que p21 tiene una fuerte acción represora sobre genes relacionados con la progresión del ciclo celular, mitosis y replicación del DNA (fig 4.44 y 4.45). Parece lógico pensar que una fuerte parada en la proliferación como la que induce p21, tenga su reflejo en la represión de genes necesarios para la progresión por el ciclo celular. Entre los genes reprimidos encontramos genes que codifican para la biosíntesis de nucleótidos como es DHFR. Otras genes están involucradas en la replicación del DNA y en la formación de los cromosomas por ejemplo ORC-1, MCM7, SMC1 H4, RPA2, CENPF y CENPE. Sobre todo hallamos genes involucradas en el ciclo celular y mitosis. Algunas de estos genes son CDK2 y CCNE necesarios para la fase S, los genes CDC2, CCNB, CCNA, WEE1 y Cdc25 A, B, C que participan en la transición G2/M, las proteínas PLK1, AURKA y KIF4A involucradas en diferentes fases de la mitosis y también genes que forman parte del control de la anafase BUB1, BUB3, MAD2L1. Además, hemos hallado genes que participan en la reparación del DNA inducidos como ERRC5, PARP4 y LIG4, pero otros reprimidos como RAD51, EXO1.

Muchos de los datos obtenidos concuerdan con los hallados por el grupo de Roninson (Chang et al., 2000b), la diferencia es que en su trabajo los datos obtenidos del microarray eran a las 72 h lo que hace suscitar la duda de que se esté observando un efecto indirecto de la parada de ciclo celular. Sin embargo, nosotros en observamos mediante RT-PCR o Northern Blot, que la represión de los genes aparece en muchos de ellos alrededor de las 6 h de inducción de p21 (fig 4.46 y 4.47), e incluso observamos 4 genes (WEE1, KIF4A, CCNE2 y CENPF), donde la represión se aprecia incluso a tiempos de 3 h de inducción de p21 (fig 4.49), una cinética paralela a la inducción de p21. Por otro lado, aportamos un dato más relevante y es el hecho de que el estudio realizado en el modelo Kp27, también demuestra una represión de estos genes (dato esperable por ser un inhibidor de ciclo celular) pero no tan severa como la observada con p21 (fig 4.48). En algunos casos, la represión por parte de p27 se observa retardada en el tiempo respecto a p21, esto podría ser consecuencia del retardo en la expresión de p27. Las

células Kp27, presentan el máximo de expresión de p27 a las 24 h de inducción con $ZnSO_4$, mientras que la de p21 es a las 12 h (Munoz-Alonso et al., 2005).

En resumen, nuestro trabajo amplía el número de genes que podrían ser reprimidos transcripcionalmente por p21. Sin duda, y como es de esperar, algunos de los genes reprimidos contienen sitios de unión para E2F en sus promotores (CDC2, ORC-1 o CCNE1), lo que demuestra que algunos de los efectos observados son consecuencia del papel inhibitorio de p21 sobre los complejos Cdk-ciclinas o bien que p21 podría estar reclutando a E2F en los promotores de estos genes y de este modo actuando como un co-represor, tal y como se ha visto para Wnt4 (Devgan et al., 2005), Myc y Cdc25A (Vigneron et al., 2006). Sin embargo otros genes, no presentan sitios de unión para E2F (CCNB1 y CCNE2). Por lo tanto, no todos los efectos inhibitorios de p21 están mediados por E2F. Siguiendo con esta observación, el grupo de Roninson (Zhu et al., 2002) demostró la capacidad de p21 para inhibir el promotor de PLK-1 y TOPOIIα independientemente de E2F. Por lo tanto, está pendiente de esclarecer la dependencia de E2F para la represión observada en los genes de este estudio. Además necesitaremos precisar cuántos de estos genes son reprimidos por un efecto directo llevado a cabo por p21 y cuántos son consecuencia de un efecto secundario debido a la parada de ciclo celular tras la inhibición de complejos Cdks.

En un paso más por esclarecer qué dominio de la proteína p21 era responsable de la represión observada en genes relacionados con ciclo celular, mitosis y replicación del DNA, realizamos un estudio con mutantes de la proteína p21 para observar diferencias en el transcriptoma de K562. Estudios anteriores realizados por el grupo de P. Dotto (Cutaneous Biology Cancer Research, MGH, Boston), determinaron que el dominio carboxilo terminal de p21 (desprovisto de la capacidad de unirse a complejos Cdk-ciclina) era responsable de la represión de Wnt4, y que esta represión de la transcripción de Wnt4 tenía lugar de manera independiente a los efectos de p21 sobre el ciclo celular (Devgan et al., 2005). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis demuestran que el dominio amino terminal es necesario para observar una represión de los estudiados. Lo que queda indudablemente demostrado, es la mayor represión por parte de la proteína silvestre (WT) respecto a los otros dos mutantes de p21 (NT y Ct) (fig 4.51).

Como conclusión final a este apartado, podemos señalar que el aumento de expresión de p21 a tiempos cortos de inducción conlleva: 1) represión de un importante número de genes que participan en ciclo celular, mitosis y reparación del

DNA, 2) la represión de algunos de estos genes (CCNE2, WEE1, CENPF, KIF4A) se observa a tiempos cortos de inducción de p21 con $ZnSO_4$ (3 h) de forma paralela a los niveles de p21, 3) p21 reprime más drásticamente estos genes de lo que lo hace p27, 4) la forma silvestre de la proteína es más represora que los mutantes que solo tiene el dominio C-terminal ó N-terminal.

5.6 p21 no es un marcador de pronóstico en cáncer colorectal.

p21 es una proteína que presenta varias mutaciones en cáncer (Balbin et al., 1996; Bhatia et al., 1995; Gao et al., 1995; Malkowicz et al., 1996; Vidal et al., 1995) y algunas de ellas alteran su actividad como inhibidor de Cdk (Welcker et al., 1998). Sin embargo, la conclusión en conjunto de todos los estudios, es que las mutaciones de p21 en cáncer son extremadamente raras, si se comparan con otros supresores de tumores como p53 y p16 (McKenzie et al., 1997; Patino-Garcia et al., 1998; Shiohara et al., 1994). Los niveles de expresión de p21 han servido para extraer conclusiones sobre la actividad de p53 (niveles bajos de p21 suelen correlacionarse con p53 inactiva). Muchos estudios describen que la perdida o el silenciamiento de p21 se correlaciona con carcinogénesis y peor pronóstico, y entre estos tumores existe un estudio en cáncer colorectal (Zirbes et al., 2000). Sin embargo, otros trabajos relaciona el incremento en la expresión de p21 con la progresión tumoral y peor pronóstico, este es por ejemplo el caso del cáncer de mama (Ceccarelli et al., 2001) (ver 1.2.5).

En este trabajo de Tesis, hemos realizado un estudio de p21, p27 y p57 y de c-Myc en una serie limitada de muestras de pacientes con CCR basado en western blot (fig 4.52). De los resultados obtenidos sobre la expresión de p21, no podemos extraer una conclusión clara: más de la mitad de las muestras tumorogénicas analizadas no presentaban cambios de expresión de p21 respecto al tejido normal, a pesar de ser pacientes que se hallaban en estadios avanzados de la enfermedad (estadio III y IV). Este resultado estaría de acuerdo con la mayoría de la bibliografía descrita para p21, que indica que p21 no es un marcador independiente de pronóstico en CCR. Sin embargo, hemos observado modificaciones en la expresión de p27. En nuestro estudio, los niveles de p27 muestran un descenso que se asocia con un avance de la enfermedad. Este resultado, concuerda con lo descrito para CCR (Loda et al., 1997). En este trabajo se realizó un estudio de la expresión de p27 en 149 carcinomas

colorectales basados en técnicas de inmunohistoquimica, encontrando que los pacientes que expresaban p27 tenían una supervivencia mayor que los pacientes con baja expresión o sin expresión. En el estudio multivariable, Loda et al., (1997) encontraron que la ausencia de p27 es un factor de mal pronóstico independiente en el cáncer colorectal y particularmente en pacientes en estadio II. Nuestro estudio es el primero (en cuanto a los publicados) que se emprende por western blot y tiende a confirmar este resultado.

El estudio realizado sobre la expresión de Myc, no mostró diferencias relevantes. Tan sólo observamos una disminución en la expresión de Myc, en los estadios más avanzados de la enfermedad. Esto concuerda por lo observado en otro trabajo donde no hallan relación entre niveles aumentados de Myc y el transcurso de la enfermedad (Augenlicht et al., 1997).

En resumen, este estudio es preliminar, pero con el número relativamente bajo de muestras analizadas se concluye que: 1) p21 no parece ser un marcador de pronóstico en CCR, y 2) una vez más, ha quedado demostrada la relación de p27 con cáncer.

6.~ CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. El fármaco inhibidor tirosina-quinasa imatinib induce apoptosis en células HCT116p21$^{-/-}$ y no en células HCT116 parentales (WT) y HCT116p53$^{-/-}$. El efecto citotóxico de imatinib en células HCT116p21$^{-/-}$ es dependiente de p53.

2. La represión en la expresión de p21 por siRNA o la inducción ectópica condicional de p21, no induce cambios en la sensibilidad a imatinib.

3. Las células HCT116p21$^{-/-}$ presentan un aumento de estabilidad de la proteína p53 que se correlaciona con una mayor expresión y actividad de la proteína.

4. La represión de p21 por siRNA o la inducción ectópica condicional de p21, no modifica la sobre-expresión de la proteína p53.

5. La estabilización de p53 es responsable de la apoptosis observada en la línea celular HCT116p21$^{-/-}$ en respuesta a inhibidores tirosina-quinasa y fármacos genotóxicos como adriamicina. Los resultados publicados previamente describiendo el papel protector de p21 con fármacos anti-tumorales en esta línea celular han de ser revisados.

6. La expresión ectópica de p21 en células mieloides K562 protege a las células de la apoptosis inducida por imatinib, a diferencia de lo observado en células HCT116p21$^{-/-}$.

7. p21 regula negativamente genes relacionados con ciclo celular, mitosis y replicación del DNA, con una cinética consistente con su función como co-represor.

8. La cinética de represión de estos genes por p21 es más marcada que por p27.

9. El dominio amino terminal de p21 es necesario para la función represora de la proteína p21.

10. p21, medido a nivel de proteína por immunoblot, no parece ser un marcador de pronóstico en cáncer colorectal (CCR).

7.~ BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Aaltomaa, S., Lipponen, P., Eskelinen, M., Ala-Opas, M. and Kosma, V. M. (1999). Prognostic value and expression of p21(waf1/cip1) protein in prostate cancer. *Prostate* **39**, 8-15.

Acosta, J. C., Richard, C., Delgado, M. D., Horita, M., Rizzo, M. G., Fernandez-Luna, J. L. and Leon, J. (2003). Amifostine impairs p53-mediated apoptosis of human myeloid leukemia cells. *Mol Cancer Ther* **2**, 893-900.

Adkins, J. N. and Lumb, K. J. (2000). Stoichiometry of cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 inhibition by p21Cip1/Waf1. *Biochemistry* **39**, 13925-30.

Agell, N., Jaumot, M., Rodriguez-Vilarrupla, A., Brun, S., Abella, N., Canela, N., Estanyol, J. M. and Bachs, O. (2006). The diverging roles of calmodulin and PKC in the regulation of p21 intracellular localization. *Cell Cycle* **5**, 3-6.

Ahmed, W., Rahmani, M., Dent, P. and Grant, S. (2004). The cyclin-dependent kinase inhibitor p21(CIP1/WAF1) blocks paclitaxel-induced G2M arrest and attenuates mitochondrial injury and apoptosis in p53-null human leukemia cells. *Cell Cycle* **3**, 1305-11.

Alt, J. R., Gladden, A. B. and Diehl, J. A. (2002). p21(Cip1) Promotes cyclin D1 nuclear accumulation via direct inhibition of nuclear export. *J Biol Chem* **277**, 8517-23.

Andrews, G. K. (2000). Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem Pharmacol* **59**, 95-104.

Aneja, R., Dhiman, N., Idnani, J., Awasthi, A., Arora, S. K., Chandra, R. and Joshi, H. C. (2007). Preclinical pharmacokinetics and bioavailability of noscapine, a tubulin-binding anticancer agent. *Cancer Chemother Pharmacol*.

Anttila, M. A., Kosma, V. M., Hongxiu, J., Puolakka, J., Juhola, M., Saarikoski, S. and Syrjanen, K. (1999). p21/WAF1 expression as related to p53, cell proliferation and prognosis in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* **79**, 1870-8.

Archer, S. Y., Meng, S., Shei, A. and Hodin, R. A. (1998). p21(WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6791-6.

Arima, Y., Nitta, M., Kuninaka, S., Zhang, D., Fujiwara, T., Taya, Y., Nakao, M. and Saya, H. (2005). Transcriptional blockade induces p53-dependent apoptosis associated with translocation of p53 to mitochondria. *J Biol Chem* **280**, 19166-76.

Asada, M., Yamada, T., Ichijo, H., Delia, D., Miyazono, K., Fukumuro, K. and Mizutani, S. (1999). Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *Embo J* **18**, 1223-34.

Attoub, S., Rivat, C., Rodrigues, S., Van Bocxlaer, S., Bedin, M., Bruyneel, E., Louvet, C., Kornprobst, M., Andre, T., Mareel, M. et al. (2002). The c-kit tyrosine kinase inhibitor STI571 for colorectal cancer therapy. *Cancer Res* **62**, 4879-83.

Augenlicht, L. H., Wadler, S., Corner, G., Richards, C., Ryan, L., Multani, A. S., Pathak, S., Benson, A., Haller, D. and Heerdt, B. G. (1997). Low-level c-myc amplification in human colonic carcinoma cell lines and tumors: a frequent, p53-independent mutation associated with improved outcome in a randomized multi-institutional trial. *Cancer Res* **57**, 1769-75.

Augustin, M., Bamberger, C., Paul, D. and Schmale, H. (1998). Cloning and chromosomal mapping of the human p53-related KET gene to chromosome 3q27 and its murine homolog Ket to mouse chromosome 16. *Mamm Genome* **9**, 899-902.

Avantaggiati, M. L., Ogryzko, V., Gardner, K., Giordano, A., Levine, A. S. and Kelly, K. (1997). Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell* **89**, 1175-84.

Bae, D. S., Cho, S. B., Kim, Y. J., Whang, J. D., Song, S. Y., Park, C. S., Kim, D. S. and Lee, J. H. (2001). Aberrant expression of cyclin D1 is associated with poor prognosis in early stage cervical cancer of the uterus. *Gynecol Oncol* **81**, 341-7.

Bakiri, L., Lallemand, D., Bossy-Wetzel, E. and Yaniv, M. (2000). Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *Embo J* **19**, 2056-68.

Balbin, M., Hannon, G. J., Pendas, A. M., Ferrando, A. A., Vizoso, F., Fueyo, A. and Lopez-Otin, C. (1996). Functional analysis of a p21WAF1,CIP1,SDI1 mutant (Arg94 --> Trp) identified in a human breast carcinoma. Evidence that the mutation impairs the ability of p21 to inhibit cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem* **271**, 15782-6.

Baretton, G. B., Klenk, U., Diebold, J., Schmeller, N. and Lohrs, U. (1999). Proliferation- and apoptosis-associated factors in advanced prostatic carcinomas before and after androgen deprivation therapy: prognostic significance of p21/WAF1/CIP1 expression. *Br J Cancer* **80**, 546-55.

Bartha, E., Olah, E., Szelenyi, J. G. and Hollan, S. R. (1987). Characterization of "fetal-type" acetylcholinesterase in hemin-treated K562 cell culture. *Blood Cells* **12**, 647-55.

Bates, S., Bonetta, L., MacAllan, D., Parry, D., Holder, A., Dickson, C. and Peters, G. (1994). CDK6 (PLSTIRE) and CDK4 (PSK-J3) are a distinct subset of the cyclin-dependent kinases that associate with cyclin D1. *Oncogene* **9**, 71-9.

Beijersbergen, R. L. and Bernards, R. (1996). Cell cycle regulation by the retinoblastoma family of growth inhibitory proteins. *Biochim Biophys Acta* **1287**, 103-20.

Bellone, G., Carbone, A., Sibona, N., Bosco, O., Tibaudi, D., Smirne, C., Martone, T., Gramigni, C., Camandona, M., Emanuelli, G. et al. (2001). Aberrant activation of c-kit protects colon carcinoma cells against apoptosis and enhances their invasive potential. *Cancer Res* **61**, 2200-6.

Benchimol, S. (2001). p53-dependent pathways of apoptosis. *Cell Death Differ* **8**, 1049-51.

Berthet, C., Aleem, E., Coppola, V., Tessarollo, L. and Kaldis, P. (2003). Cdk2 knockout mice are viable. *Curr Biol* **13**, 1775-85.

Bhatia, K., Fan, S., Spangler, G., Weintraub, M., O'Connor, P. M., Judde, J. G. and Magrath, I. (1995). A mutant p21 cyclin-dependent kinase inhibitor isolated from a Burkitt's lymphoma. *Cancer Res* **55**, 1431-5.

Bienz, B., Zakut-Houri, R., Givol, D. and Oren, M. (1984). Analysis of the gene coding for the murine cellular tumour antigen p53. *Embo J* **3**, 2179-83.

Binaschi, M., Zunino, F. and Capranico, G. (1995). Mechanism of action of DNA topoisomerase inhibitors. *Stem Cells* **13**, 369-79.

Blagosklonny, M. V. (1997). Loss of function and p53 protein stabilization. *Oncogene* **15**, 1889-93.

Blangy, A., Lane, H. A., d'Herin, P., Harper, M., Kress, M. and Nigg, E. A. (1995). Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell* **83**, 1159-69.

Bloom, J., Amador, V., Bartolini, F., DeMartino, G. and Pagano, M. (2003). Proteasome-mediated degradation of p21 via N-terminal ubiquitinylation. *Cell* **115**, 71-82.

Botz, J., Zerfass-Thome, K., Spitkovsky, D., Delius, H., Vogt, B., Eilers, M., Hatzigeorgiou, A. and Jansen-Durr, P. (1996). Cell cycle regulation of the murine cyclin E gene depends on an E2F binding site in the promoter. *Mol Cell Biol* **16**, 3401-9.

Bourdon, J. C., Fernandes, K., Murray-Zmijewski, F., Liu, G., Diot, A., Xirodimas, D. P., Saville, M. K. and Lane, D. P. (2005). p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev* **19**, 2122-37.

Bowman, T., Symonds, H., Gu, L., Yin, C., Oren, M. and Van Dyke, T. (1996). Tissue-specific inactivation of p53 tumor suppression in the mouse. *Genes Dev* **10**, 826-35.

Brattain, M. G., Fine, W. D., Khaled, F. M., Thompson, J. and Brattain, D. E. (1981). Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res* **41**, 1751-6.

Brattain, M. G., Kimball, P. M., Pretlow, T. G., 2nd and Pitts, A. M. (1977). Partial purification of human colonic carcinoma cells by sedimentation. *Br J Cancer* **35**, 850-7.

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

Bromberg, J. and Darnell, J. E., Jr. (2000). The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* **19**, 2468-73.

Broude, E. V., Demidenko, Z. N., Vivo, C., Swift, M. E., Davis, B. M., Blagosklonny, M. V. and Roninson, I. B. (2007). p21 (CDKN1A) is a negative regulator of p53 stability. *Cell Cycle* **6**, 1468-71.

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**, 737-42.

Brugarolas, J., Bronson, R. T. and Jacks, T. (1998). p21 is a critical CDK2 regulator essential for proliferation control in Rb-deficient cells. *J Cell Biol* **141**, 503-14.

Brugarolas, J., Moberg, K., Boyd, S. D., Taya, Y., Jacks, T. and Lees, J. A. (1999). Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by p21 is necessary for retinoblastoma protein-mediated G1 arrest after gamma-irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1002-7.

Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J. P., Sedivy, J. M., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* **282**, 1497-501.

Bunz, F., Hwang, P. M., Torrance, C., Waldman, T., Zhang, Y., Dillehay, L., Williams, J., Lengauer, C., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1999). Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Invest* **104**, 263-9.

Caffo, O., Doglioni, C., Veronese, S., Bonzanini, M., Marchetti, A., Buttitta, F., Fina, P., Leek, R., Morelli, L., Palma, P. D. et al. (1996). Prognostic value of p21(WAF1) and p53 expression in breast carcinoma: an immunohistochemical study in 261 patients with long-term follow-up. *Clin Cancer Res* **2**, 1591-9.

Canelles, M., Delgado, M. D., Hyland, K. M., Lerga, A., Richard, C., Dang, C. V. and Leon, J. (1997). Max and inhibitory c-Myc mutants induce erythroid differentiation and resistance to apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Oncogene* **14**, 1315-27.

Capdeville, R., Buchdunger, E., Zimmermann, J. and Matter, A. (2002). Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 493-502.

Carlson, C. R., Witczak, O., Vossebein, L., Labbe, J. C., Skalhegg, B. S., Keryer, G., Herberg, F. W., Collas, P. and Tasken, K. (2001). CDK1-mediated phosphorylation of the RIIalpha regulatory subunit of PKA works as a molecular switch that promotes dissociation of RIIalpha from centrosomes at mitosis. *J Cell Sci* **114**, 3243-54.

Ceballos, E., Delgado, M. D., Gutierrez, P., Richard, C., Muller, D., Eilers, M., Ehinger, M., Gullberg, U. and Leon, J. (2000). c-Myc antagonizes the effect of p53 on apoptosis and p21WAF1 transactivation in K562 leukemia cells. *Oncogene* **19**, 2194-204.

Ceballos, E., Munoz-Alonso, M. J., Berwanger, B., Acosta, J. C., Hernandez, R., Krause, M., Hartmann, O., Eilers, M. and Leon, J. (2005). Inhibitory effect of c-Myc on p53-induced apoptosis in leukemia cells. Microarray analysis reveals defective induction of p53 target genes and upregulation of chaperone genes. *Oncogene* **24**, 4559-71.

Ceccarelli, C., Santini, D., Chieco, P., Lanciotti, C., Taffurelli, M., Paladini, G. and Marrano, D. (2001). Quantitative p21(waf-1)/p53 immunohistochemical analysis defines groups of primary invasive breast carcinomas with different prognostic indicators. *Int J Cancer* **95**, 128-34.

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**, 2682-8.

Chan, T. A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1999). 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* **401**, 616-20.

Chan, T. A., Hwang, P. M., Hermeking, H., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (2000). Cooperative effects of genes controlling the G(2)/M checkpoint. *Genes Dev* **14**, 1584-8.

Chang, B. D., Broude, E. V., Fang, J., Kalinichenko, T. V., Abdryashitov, R., Poole, J. C. and Roninson, I. B. (2000a). p21Waf1/Cip1/Sdi1-induced growth arrest is associated with depletion of mitosis-control proteins and leads to abnormal mitosis and endoreduplication in recovering cells. *Oncogene* **19**, 2165-70.

Chang, B. D., Watanabe, K., Broude, E. V., Fang, J., Poole, J. C., Kalinichenko, T. V. and Roninson, I. B. (2000b). Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4291-6.

Chattopadhyay, D., Ghosh, M. K., Mal, A. and Harter, M. L. (2001). Inactivation of p21 by E1A leads to the induction of apoptosis in DNA-damaged cells. *J Virol* **75**, 9844-56.

Chehab, N. H., Malikzay, A., Stavridi, E. S. and Halazonetis, T. D. (1999). Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13777-82.

Chen, B., He, L., Savell, V. H., Jenkins, J. J. and Parham, D. M. (2000). Inhibition of the interferon-gamma/signal transducers and activators of transcription (STAT) pathway by hypermethylation at a STAT-binding site in the p21WAF1 promoter region. *Cancer Res* **60**, 3290-8.

Chen, J., Saha, P., Kornbluth, S., Dynlacht, B. D. and Dutta, A. (1996). Cyclin-binding motifs are essential for the function of p21CIP1. *Mol Cell Biol* **16**, 4673-82.

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**, 1571-83.

Cheung, T. H., Lo, K. W., Yu, M. M., Yim, S. F., Poon, C. S., Chung, T. K. and Wong, Y. F. (2001). Aberrant expression of p21(WAF1/CIP1) and p27(KIP1) in cervical carcinoma. *Cancer Lett* **172**, 93-8.

Chin, Y. E., Kitagawa, M., Su, W. C., You, Z. H., Iwamoto, Y. and Fu, X. Y. (1996). Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science* **272**, 719-22.

Chinery, R., Brockman, J. A., Peeler, M. O., Shyr, Y., Beauchamp, R. D. and Coffey, R. J. (1997). Antioxidants enhance the cytotoxicity of chemotherapeutic agents in colorectal

cancer: a p53-independent induction of p21WAF1/CIP1 via C/EBPbeta. *Nat Med* **3**, 1233-41.

Chipuk, J. E., Bouchier-Hayes, L., Kuwana, T., Newmeyer, D. D. and Green, D. R. (2005). PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science* **309**, 1732-5.

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**, 1010-4.

Claassen, G. F. and Hann, S. R. (2000). A role for transcriptional repression of p21CIP1 by c-Myc in overcoming transforming growth factor beta -induced cell-cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9498-503.

Clurman, B. E., Sheaff, R. J., Thress, K., Groudine, M. and Roberts, J. M. (1996). Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation. *Genes Dev* **10**, 1979-90.

Collins, S., Coleman, H. and Groudine, M. (1987). Expression of bcr and bcr-abl fusion transcripts in normal and leukemic cells. *Mol Cell Biol* **7**, 2870-6.

Cooper, G. and Hausman, R. (2004). The Cell. A Molecular Approach. Washington DC: ASM Press.

Coqueret, O. (2003). New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol* **13**, 65-70.

Coqueret, O. and Gascan, H. (2000). Functional interaction of STAT3 transcription factor with the cell cycle inhibitor p21WAF1/CIP1/SDI1. *J Biol Chem* **275**, 18794-800.

Cross, S. M., Sanchez, C. A., Morgan, C. A., Schimke, M. K., Ramel, S., Idzerda, R. L., Raskind, W. H. and Reid, B. J. (1995). A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science* **267**, 1353-6.

Cuadrado, A., Lafarga, V., Cheung, P. C., Dolado, I., Llanos, S., Cohen, P. and Nebreda, A. R. (2007). A new p38 MAP kinase-regulated transcriptional coactivator that stimulates p53-dependent apoptosis. *Embo J* **26**, 2115-26.

Cullinane, C. and Phillips, D. R. (1990). Induction of stable transcriptional blockage sites by adriamycin: GpC specificity of apparent adriamycin-DNA adducts and dependence on iron(III) ions. *Biochemistry* **29**, 5638-46.

Dannenberg, J. H., van Rossum, A., Schuijff, L. and te Riele, H. (2000). Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G(1) control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions. *Genes Dev* **14**, 3051-64.

Datto, M. B., Yu, Y. and Wang, X. F. (1995). Functional analysis of the transforming growth factor beta responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter. *J Biol Chem* **270**, 28623-8.

De la Cueva, E., Garcia-Cao, I., Herranz, M., Lopez, P., Garcia-Palencia, P., Flores, J. M., Serrano, M., Fernandez-Piqueras, J. and Martin-Caballero, J. (2006). Tumorigenic activity of p21Waf1/Cip1 in thymic lymphoma. *Oncogene* **25**, 4128-32.

Deininger, M. W. (2005). Imatinib-an overview. *haematologica reports* **1**, 20-27.

Delavaine, L. and La Thangue, N. B. (1999). Control of E2F activity by p21Waf1/Cip1. *Oncogene* **18**, 5381-92.

Delgado, M. D., Lerga, A., Canelles, M., Gomez-Casares, M. T. and Leon, J. (1995). Differential regulation of Max and role of c-Myc during erythroid and myelomonocytic differentiation of K562 cells. *Oncogene* **10**, 1659-65.

Delgado, M. D., Quincoces, A. F., Gomez-Casares, M. T., Martinez, C. A., Cuadrado, M. A., Richard, C. and Leon, J. (1992). Differential expression of ras protooncogenes during in vitro differentiation of human erythroleukemia cells. *Cancer Res* **52**, 5979-84.

Delgado, M. D., Vaque, J. P., Arozarena, I., Lopez-Ilasaca, M. A., Martinez, C., Crespo, P. and Leon, J. (2000). H-, K- and N-Ras inhibit myeloid leukemia cell proliferation by a p21WAF1-dependent mechanism. *Oncogene* **19**, 783-90.

Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W., Elledge, S. J. and Leder, P. (1995). Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* **82**, 675-84.

Denicourt, C. and Dowdy, S. F. (2004). Cip/Kip proteins: more than just CDKs inhibitors. *Genes Dev* **18**, 851-5.

Dessev, G., Iovcheva-Dessev, C., Bischoff, J. R., Beach, D. and Goldman, R. (1991). A complex containing p34cdc2 and cyclin B phosphorylates the nuclear lamin and disassembles nuclei of clam oocytes in vitro. *J Cell Biol* **112**, 523-33.

Devgan, V., Mammucari, C., Millar, S. E., Brisken, C. and Dotto, G. P. (2005). p21WAF1/Cip1 is a negative transcriptional regulator of Wnt4 expression downstream of Notch1 activation. *Genes Dev* **19**, 1485-95.

Ding, H. F., Lin, Y. L., McGill, G., Juo, P., Zhu, H., Blenis, J., Yuan, J. and Fisher, D. E. (2000). Essential role for caspase-8 in transcription-independent apoptosis triggered by p53. *J Biol Chem* **275**, 38905-11.

Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Jr., Butel, J. S. and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**, 215-21.

Dotto, G. P. (2000). p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim Biophys Acta* **1471**, M43-56.

Druker, B. J. (2001). STI-571 for chronic myeloid leukaemia. *The Hematology Journal* **551**.

Druker, B. J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G. M., Fanning, S., Zimmermann, J. and Lydon, N. B. (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* **2**, 561-6.

Dulic, V., Kaufmann, W. K., Wilson, S. J., Tlsty, T. D., Lees, E., Harper, J. W., Elledge, S. J. and Reed, S. I. (1994). p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* **76**, 1013-23.

Dulic, V., Stein, G. H., Far, D. F. and Reed, S. I. (1998). Nuclear accumulation of p21Cip1 at the onset of mitosis: a role at the G2/M-phase transition. *Mol Cell Biol* **18**, 546-57.

Dumaz, N. and Meek, D. W. (1999). Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *Embo J* **18**, 7002-10.

Dunaief, J. L., Strober, B. E., Guha, S., Khavari, P. A., Alin, K., Luban, J., Begemann, M., Crabtree, G. R. and Goff, S. P. (1994). The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest. *Cell* **79**, 119-30.

Efeyan, A., Collado, M., Velasco-Miguel, S. and Serrano, M. (2007). Genetic dissection of the role of p21Cip1/Waf1 in p53-mediated tumour suppression. *Oncogene* **26**, 1645-9.

Eggert, M., Radomski, N., Linder, D., Tripier, D., Traub, P. and Jost, E. (1993). Identification of novel phosphorylation sites in murine A-type lamins. *Eur J Biochem* **213**, 659-71.

El-Deiry, W. S. (2001). Akt takes centre stage in cell-cycle deregulation. *Nat Cell Biol* **3**, E71-3.

el-Deiry, W. S., Harper, J. W., O'Connor, P. M., Velculescu, V. E., Canman, C. E., Jackman, J., Pietenpol, J. A., Burrell, M., Hill, D. E., Wang, Y. et al. (1994). WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* **54**, 1169-74.

el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817-25.

Elledge, S. J., Richman, R., Hall, F. L., Williams, R. T., Lodgson, N. and Harper, J. W. (1992). CDK2 encodes a 33-kDa cyclin A-associated protein kinase and is expressed before CDC2 in the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2907-11.

Endl, E. and Gerdes, J. (2000). Posttranslational modifications of the KI-67 protein coincide with two major checkpoints during mitosis. *J Cell Physiol* **182**, 371-80.

Espinosa, J. M. and Emerson, B. M. (2001). Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment. *Mol Cell* **8**, 57-69.

Estanyol, J. M., Jaumot, M., Casanovas, O., Rodriguez-Vilarrupla, A., Agell, N. and Bachs, O. (1999). The protein SET regulates the inhibitory effect of p21(Cip1) on cyclin E-cyclin-dependent kinase 2 activity. *J Biol Chem* **274**, 33161-5.

Esteve, P. O., Chin, H. G. and Pradhan, S. (2005). Human maintenance DNA (cytosine-5)-methyltransferase and p53 modulate expression of p53-repressed promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1000-5.

Esteve, P. O., Chin, H. G. and Pradhan, S. (2007). Molecular mechanisms of transactivation and doxorubicin-mediated repression of survivin gene in cancer cells. *J Biol Chem* **282**, 2615-25.

Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D. and Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **33**, 389-96.

Fabregat, I., Roncero, C. and Fernandez, M. (2007). Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer. *Liver Int* **27**, 155-62.

Ferrandina, G., Stoler, A., Fagotti, A., Fanfani, F., Sacco, R., De Pasqua, A., Mancuso, S. and Scambia, G. (2000). p21WAF1/CIP1 protein expression in primary ovarian cancer. *Int J Oncol* **17**, 1231-5.

Flores-Rozas, H., Kelman, Z., Dean, F. B., Pan, Z. Q., Harper, J. W., Elledge, S. J., O'Donnell, M. and Hurwitz, J. (1994). Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase delta holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8655-9.

Frampton, J. E. and Easthope, S. E. (2004). Gefitinib: a review of its use in the management of advanced non-small-cell lung cancer. *Drugs* **64**, 2475-92.

Franklin, D. S., Godfrey, V. L., O'Brien, D. A., Deng, C. and Xiong, Y. (2000). Functional collaboration between different cyclin-dependent kinase inhibitors suppresses tumor growth with distinct tissue specificity. *Mol Cell Biol* **20**, 6147-58.

Fridman, J. S. and Lowe, S. W. (2003). Control of apoptosis by p53. *Oncogene* **22**, 9030-40.

Fritah, A., Saucier, C., Mester, J., Redeuilh, G. and Sabbah, M. (2005). p21WAF1/CIP1 selectively controls the transcriptional activity of estrogen receptor alpha. *Mol Cell Biol* **25**, 2419-30.

Furuta, T., Hayward, R. L., Meng, L. H., Takemura, H., Aune, G. J., Bonner, W. M., Aladjem, M. I., Kohn, K. W. and Pommier, Y. (2006). p21CDKN1A allows the repair of replication-mediated DNA double-strand breaks induced by topoisomerase I and is inactivated by the checkpoint kinase inhibitor 7-hydroxystaurosporine. *Oncogene* **25**, 2839-49.

Fuster, J. J., Sanz-Gonzalez, S. M., Moll, U. M. and Andres, V. (2007). Classic and novel roles of p53: prospects for anticancer therapy. *Trends Mol Med*.

Gambacorti-Passerini, C., le Coutre, P., Mologni, L., Fanelli, M., Bertazzoli, C., Marchesi, E., Di Nicola, M., Biondi, A., Corneo, G. M., Belotti, D. et al. (1997). Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis. *Blood Cells Mol Dis* **23**, 380-94.

Gao, X., Chen, Y. Q., Wu, N., Grignon, D. J., Sakr, W., Porter, A. T. and Honn, K. V. (1995). Somatic mutations of the WAF1/CIP1 gene in primary prostate cancer. *Oncogene* **11**, 1395-8.

Garcia-Cao, I., Garcia-Cao, M., Martin-Caballero, J., Criado, L. M., Klatt, P., Flores, J. M., Weill, J. C., Blasco, M. A. and Serrano, M. (2002). "Super p53" mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *Embo J* **21**, 6225-35.

Gartel, A. L., Serfas, M. S. and Tyner, A. L. (1996). p21--negative regulator of the cell cycle. *Proc Soc Exp Biol Med* **213**, 138-49.

Gartel, A. L. and Shchors, K. (2003). Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes. *Exp Cell Res* **283**, 17-21.

Gartel, A. L. and Tyner, A. L. (2002). The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* **1**, 639-49.

Gartel, A. L., Ye, X., Goufman, E., Shianov, P., Hay, N., Najmabadi, F. and Tyner, A. L. (2001). Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4510-5.

Geller, J. I., Szekely-Szucs, K., Petak, I., Doyle, B. and Houghton, J. A. (2004). P21Cip1 is a critical mediator of the cytotoxic action of thymidylate synthase inhibitors in colorectal carcinoma cells. *Cancer Res* **64**, 6296-303.

Geng, Y., Eaton, E. N., Picon, M., Roberts, J. M., Lundberg, A. S., Gifford, A., Sardet, C. and Weinberg, R. A. (1996). Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene* **12**, 1173-80.

Geng, Y., Yu, Q., Sicinska, E., Das, M., Schneider, J. E., Bhattacharya, S., Rideout, W. M., Bronson, R. T., Gardner, H. and Sicinski, P. (2003). Cyclin E ablation in the mouse. *Cell* **114**, 431-43.

Giannakakou, P., Robey, R., Fojo, T. and Blagosklonny, M. V. (2001). Low concentrations of paclitaxel induce cell type-dependent p53, p21 and G1/G2 arrest instead of mitotic arrest: molecular determinants of paclitaxel-induced cytotoxicity. *Oncogene* **20**, 3806-13.

Glisson, B. S. and Ross, W. E. (1987). DNA topoisomerase II: a primer on the enzyme and its unique role as a multidrug target in cancer chemotherapy. *Pharmacol Ther* **32**, 89-106.

Gomez-Casares, M. T., Delgado, M. D., Lerga, A., Crespo, P., Quincoces, A. F., Richard, C. and Leon, J. (1993). Down-regulation of c-myc gene is not obligatory for growth inhibition and differentiation of human myeloid leukemia cells. *Leukemia* **7**, 1824-33.

Gomez-Casares, M. T., Vaque, J. P., Lemes, A., Molero, T., Delgado, M. D. and Leon, J. (2004). C-myc expression in cell lines derived from chronic myeloid leukemia. *Haematologica* **89**, 241-3.

Gorospe, M., Wang, X., Guyton, K. Z. and Holbrook, N. J. (1996). Protective role of p21(Waf1/Cip1) against prostaglandin A2-mediated apoptosis of human colorectal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* **16**, 6654-60.

Gu, W. and Roeder, R. G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**, 595-606.

Gu, Y., Turck, C. W. and Morgan, D. O. (1993). Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature* **366**, 707-10.

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**, 2939-52.

Gulbis, J. M., Kelman, Z., Hurwitz, J., O'Donnell, M. and Kuriyan, J. (1996). Structure of the C-terminal region of p21(WAF1/CIP1) complexed with human PCNA. *Cell* **87**, 297-306.

Gursky, S., Olopade, O. I. and Rowley, J. D. (2001). Identification of a 1.2 Kb cDNA fragment from a region on 9p21 commonly deleted in multiple tumor types. *Cancer Genet Cytogenet* **129**, 93-101.

Hainaut, P. and Hollstein, M. (2000). p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* **77**, 81-137.

Hall, C., Nelson, D. M., Ye, X., Baker, K., DeCaprio, J. A., Seeholzer, S., Lipinski, M. and Adams, P. D. (2001). HIRA, the human homologue of yeast Hir1p and Hir2p, is a novel cyclin-cdk2 substrate whose expression blocks S-phase progression. *Mol Cell Biol* **21**, 1854-65.

Han, Z., Wei, W., Dunaway, S., Darnowski, J. W., Calabresi, P., Sedivy, J., Hendrickson, E. A., Balan, K. V., Pantazis, P. and Wyche, J. H. (2002). Role of p21 in apoptosis and senescence of human colon cancer cells treated with camptothecin. *J Biol Chem* **277**, 17154-60.

Hanna, Z., Jankowski, M., Tremblay, P., Jiang, X., Milatovich, A., Francke, U. and Jolicoeur, P. (1993). The Vin-1 gene, identified by provirus insertional mutagenesis, is the cyclin D2. *Oncogene* **8**, 1661-6.

Hannon, G. J. and Beach, D. (1994). p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* **371**, 257-61.

Hao, M., Lowy, A. M., Kapoor, M., Deffie, A., Liu, G. and Lozano, G. (1996). Mutation of phosphoserine 389 affects p53 function in vivo. *J Biol Chem* **271**, 29380-5.

Harbour, J. W., Luo, R. X., Dei Santi, A., Postigo, A. A. and Dean, D. C. (1999). Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* **98**, 859-69.

Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S. J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-16.

Harper, J. W., Burton, J. L. and Solomon, M. J. (2002). The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes Dev* **16**, 2179-206.

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

Harris, T. E., Albrecht, J. H., Nakanishi, M. and Darlington, G. J. (2001). CCAAT/enhancer-binding protein-alpha cooperates with p21 to inhibit cyclin-dependent kinase-2 activity and induces growth arrest independent of DNA binding. *J Biol Chem* **276**, 29200-9.

Harvey, K. J., Lukovic, D. and Ucker, D. S. (2000). Caspase-dependent Cdk activity is a requisite effector of apoptotic death events. *J Cell Biol* **148**, 59-72.

Harvey, M., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Jr., Bradley, A. and Donehower, L. A. (1993). Genetic background alters the spectrum of tumors that develop in p53-deficient mice. *Faseb J* **7**, 938-43.

Helt, C. E., Rancourt, R. C., Staversky, R. J. and O'Reilly, M. A. (2001). p53-dependent induction of p21(Cip1/WAF1/Sdi1) protects against oxygen-induced toxicity. *Toxicol Sci* **63**, 214-22.

Hemmati, P. G., Normand, G., Verdoodt, B., von Haefen, C., Hasenjager, A., Guner, D., Wendt, J., Dorken, B. and Daniel, P. T. (2005). Loss of p21 disrupts p14 ARF-induced G1 cell cycle arrest but augments p14 ARF-induced apoptosis in human carcinoma cells. *Oncogene* **24**, 4114-28.

Hendrickson, M., Madine, M., Dalton, S. and Gautier, J. (1996). Phosphorylation of MCM4 by cdc2 protein kinase inhibits the activity of the minichromosome maintenance complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12223-8.

Hengst, L., Gopfert, U., Lashuel, H. A. and Reed, S. I. (1998). Complete inhibition of Cdk/cyclin by one molecule of p21(Cip1). *Genes Dev* **12**, 3882-8.

Hoffman, W. H., Biade, S., Zilfou, J. T., Chen, J. and Murphy, M. (2002). Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem* **277**, 3247-57.

Hoh, J., Jin, S., Parrado, T., Edington, J., Levine, A. J. and Ott, J. (2002). The p53MH algorithm and its application in detecting p53-responsive genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8467-72.

Hunt, T. (1989). Maturation promoting factor, cyclin and the control of M-phase. *Curr Opin Cell Biol* **1**, 268-74.

Hunter, T. (1993). Braking the cycle. *Cell* **75**, 839-41.

Hwang, H. C. and Clurman, B. E. (2005). Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene* **24**, 2776-86.

Hwang, P. M., Bunz, F., Yu, J., Rago, C., Chan, T. A., Murphy, M. P., Kelso, G. F., Smith, R. A., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (2001). Ferredoxin reductase affects p53-dependent, 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *Nat Med* **7**, 1111-7.

Ikeda, M. A., Jakoi, L. and Nevins, J. R. (1996). A unique role for the Rb protein in controlling E2F accumulation during cell growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 3215-20.

Inaba, T., Matsushime, H., Valentine, M., Roussel, M. F., Sherr, C. J. and Look, A. T. (1992). Genomic organization, chromosomal localization, and independent expression of human cyclin D genes. *Genomics* **13**, 565-74.

Jacks, T., Remington, L., Williams, B. O., Schmitt, E. M., Halachmi, S., Bronson, R. T. and Weinberg, R. A. (1994). Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol* **4**, 1-7.

Jaiswal, A. S., Marlow, B. P., Gupta, N. and Narayan, S. (2002). Beta-catenin-mediated transactivation and cell-cell adhesion pathways are important in curcumin (diferuylmethane)-induced growth arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene* **21**, 8414-27.

Janssen, J. W., Steenvoorden, A. C., Lyons, J., Anger, B., Bohlke, J. U., Bos, J. L., Seliger, H. and Bartram, C. R. (1987). RAS gene mutations in acute and chronic myelocytic leukemias, chronic myeloproliferative disorders, and myelodysplastic syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 9228-32.

Jascur, T., Brickner, H., Salles-Passador, I., Barbier, V., El Khissiin, A., Smith, B., Fotedar, R. and Fotedar, A. (2005). Regulation of p21(WAF1/CIP1) stability by WISp39, a Hsp90 binding TPR protein. *Mol Cell* **17**, 237-49.

Javelaud, D. and Besancon, F. (2002). Inactivation of p21WAF1 sensitizes cells to apoptosis via an increase of both p14ARF and p53 levels and an alteration of the Bax/Bcl-2 ratio. *J Biol Chem* **277**, 37949-54.

Jeffers, J. R., Parganas, E., Lee, Y., Yang, C., Wang, J., Brennan, J., MacLean, K. H., Han, J., Chittenden, T., Ihle, J. N. et al. (2003). Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell* **4**, 321-8.

Jiang, H., Lin, J., Su, Z. Z., Collart, F. R., Huberman, E. and Fisher, P. B. (1994). Induction of differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells activates p21, WAF1/CIP1, expression in the absence of p53. *Oncogene* **9**, 3397-406.

Jimenez, G. S., Khan, S. H., Stommel, J. M. and Wahl, G. M. (1999). p53 regulation by post-translational modification and nuclear retention in response to diverse stresses. *Oncogene* **18**, 7656-65.

Jones, S. N., Roe, A. E., Donehower, L. A. and Bradley, A. (1995). Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* **378**, 206-8.

Jung, C., Motwani, M., Kortmansky, J., Sirotnak, F. M., She, Y., Gonen, M., Haimovitz-Friedman, A. and Schwartz, G. K. (2003). The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol potentiates gamma-irradiation-induced apoptosis in colon and gastric cancer cells. *Clin Cancer Res* **9**, 6052-61.

Jung, J. M., Bruner, J. M., Ruan, S., Langford, L. A., Kyritsis, A. P., Kobayashi, T., Levin, V. A. and Zhang, W. (1995). Increased levels of p21WAF1/Cip1 in human brain tumors. *Oncogene* **11**, 2021-8.

Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J. C., Valent, A., Minty, A., Chalon, P., Lelias, J. M., Dumont, X. et al. (1997). Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* **90**, 809-19.

Kamb, A., Gruis, N. A., Weaver-Feldhaus, J., Liu, Q., Harshman, K., Tavtigian, S. V., Stockert, E., Day, R. S., 3rd, Johnson, B. E. and Skolnick, M. H. (1994). A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* **264**, 436-40.

Kang, K. H., Kim, W. H. and Choi, K. H. (1999). p21 promotes ceramide-induced apoptosis and antagonizes the antideath effect of Bcl-2 in human hepatocarcinoma cells. *Exp Cell Res* **253**, 403-12.

Kapranos, N., Stathopoulos, G. P., Manolopoulos, L., Kokka, E., Papadimitriou, C., Bibas, A., Yiotakis, J. and Adamopoulos, G. (2001). p53, p21 and p27 protein expression in head and neck cancer and their prognostic value. *Anticancer Res* **21**, 521-8.

Kato, J. Y., Matsuoka, M., Strom, D. K. and Sherr, C. J. (1994). Regulation of cyclin D-dependent kinase 4 (cdk4) by cdk4-activating kinase. *Mol Cell Biol* **14**, 2713-21.

Keryer, G., Celati, C. and Klotz, C. (1995). In isolated human centrosomes, the associated kinases phosphorylate a specific subset of centrosomal proteins. *Biol Cell* **84**, 155-65.

Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**, 159-70.

Kitamura, S., Miyazaki, Y., Shinomura, Y., Kondo, S., Kanayama, S. and Matsuzawa, Y. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces growth arrest and differentiation markers of human colon cancer cells. *Jpn J Cancer Res* **90**, 75-80.

Kitaura, H., Shinshi, M., Uchikoshi, Y., Ono, T., Iguchi-Ariga, S. M. and Ariga, H. (2000). Reciprocal regulation via protein-protein interaction between c-Myc and p21(cip1/waf1/sdi1) in DNA replication and transcription. *J Biol Chem* **275**, 10477-83.

Kobet, E., Zeng, X., Zhu, Y., Keller, D. and Lu, H. (2000). MDM2 inhibits p300-mediated p53 acetylation and activation by forming a ternary complex with the two proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 12547-52.

Kohn, K. W. (1996). Beyond DNA cross-linking: history and prospects of DNA-targeted cancer treatment--fifteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. *Cancer Res* **56**, 5533-46.

Komiya, T., Hosono, Y., Hirashima, T., Masuda, N., Yasumitsu, T., Nakagawa, K., Kikui, M., Ohno, A., Fukuoka, M. and Kawase, I. (1997). p21 expression as a predictor for favorable prognosis in squamous cell carcinoma of the lung. *Clin Cancer Res* **3**, 1831-5.

Korkolopoulou, P., Konstantinidou, A. E., Thomas-Tsagli, E., Christodoulou, P., Kapralos, P. and Davaris, P. (2000). WAF1/p21 protein expression is an independent prognostic indicator in superficial and invasive bladder cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **8**, 285-92.

Kozar, K., Ciemerych, M. A., Rebel, V. I., Shigematsu, H., Zagozdzon, A., Sicinska, E., Geng, Y., Yu, Q., Bhattacharya, S., Bronson, R. T. et al. (2004). Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell* **118**, 477-91.

Kubbutat, M. H., Jones, S. N. and Vousden, K. H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**, 299-303.

LaBaer, J., Garrett, M. D., Stevenson, L. F., Slingerland, J. M., Sandhu, C., Chou, H. S., Fattaey, A. and Harlow, E. (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* **11**, 847-62.

Lambert, P. F., Kashanchi, F., Radonovich, M. F., Shiekhattar, R. and Brady, J. N. (1998). Phosphorylation of p53 serine 15 increases interaction with CBP. *J Biol Chem* **273**, 33048-53.

Lane, D. P. and Crawford, L. V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**, 261-3.

Latonen, L. and Laiho, M. (2005). Cellular UV damage responses--functions of tumor suppressor p53. *Biochim Biophys Acta* **1755**, 71-89.

Law, J. C., Ritke, M. K., Yalowich, J. C., Leder, G. H. and Ferrell, R. E. (1993). Mutational inactivation of the p53 gene in the human erythroid leukemic K562 cell line. *Leuk Res* **17**, 1045-50.

Le, H. V., Minn, A. J. and Massague, J. (2005). Cyclin-dependent kinase inhibitors uncouple cell cycle progression from mitochondrial apoptotic functions in DNA-damaged cancer cells. *J Biol Chem* **280**, 32018-25.

Lee, E., Choi, M. K., Han, I. O. and Lim, S. J. (2006). Role of p21CIP1 as a determinant of SC-560 response in human HCT116 colon carcinoma cells. *Exp Mol Med* **38**, 325-31.

Lee, M. H., Reynisdottir, I. and Massague, J. (1995). Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* **9**, 639-49.

Lee, M. H. and Yang, H. Y. (2001). Negative regulators of cyclin-dependent kinases and their roles in cancers. *Cell Mol Life Sci* **58**, 1907-22.

Lerga, A., Crespo, P., Berciano, M., Delgado, M. D., Canelles, M., Cales, C., Richard, C., Ceballos, E., Gutierrez, P., Ajenjo, N. et al. (1999). Regulation of c-Myc and Max in megakaryocytic and monocytic-macrophagic differentiation of K562 cells induced by protein kinase C modifiers: c-Myc is down-regulated but does not inhibit differentiation. *Cell Growth Differ* **10**, 639-54.

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**, 443-50.

Levedakou, E. N., Kaufmann, W. K., Alcorta, D. A., Galloway, D. A. and Paules, R. S. (1995). p21CIP1 is not required for the early G2 checkpoint response to ionizing radiation. *Cancer Res* **55**, 2500-2.

Li, D. Q., Hou, Y. F., Wu, J., Chen, Y., Lu, J. S., Di, G. H., Ou, Z. L., Shen, Z. Z., Ding, J. and Shao, Z. M. (2006). Gene expression profile analysis of an isogenic tumour metastasis model reveals a functional role for oncogene AF1Q in breast cancer metastasis. *Eur J Cancer* **42**, 3274-86.

Li, L. H. and Yu, F. L. (1993). Transcriptional specificities of adriamycin. *Biochem Mol Biol Int* **31**, 879-87.

Li, R., Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D. and Stillman, B. (1994a). Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature* **371**, 534-7.

Li, Y., Dowbenko, D. and Lasky, L. A. (2002). AKT/PKB phosphorylation of p21Cip/WAF1 enhances protein stability of p21Cip/WAF1 and promotes cell survival. *J Biol Chem* **277**, 11352-61.

Li, Y., Jenkins, C. W., Nichols, M. A. and Xiong, Y. (1994b). Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene* **9**, 2261-8.

Lincet, H., Poulain, L., Remy, J. S., Deslandes, E., Duigou, F., Gauduchon, P. and Staedel, C. (2000). The p21(cip1/waf1) cyclin-dependent kinase inhibitor enhances the cytotoxic effect of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Lett* **161**, 17-26.

Linzer, D. I. and Levine, A. J. (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* **17**, 43-52.

Lisztwan, J., Marti, A., Sutterluty, H., Gstaiger, M., Wirbelauer, C. and Krek, W. (1998). Association of human CUL-1 and ubiquitin-conjugating enzyme CDC34 with the F-box protein p45(SKP2): evidence for evolutionary conservation in the subunit composition of the CDC34-SCF pathway. *Embo J* **17**, 368-83.

Littlewood, T. D., Hancock, D. C., Danielian, P. S., Parker, M. G. and Evan, G. I. (1995). A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res* **23**, 1686-90.

Liu, L., Scolnick, D. M., Trievel, R. C., Zhang, H. B., Marmorstein, R., Halazonetis, T. D. and Berger, S. L. (1999). p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* **19**, 1202-9.

Ljungman, M. (2000). Dial 9-1-1 for p53: mechanisms of p53 activation by cellular stress. *Neoplasia* **2**, 208-25.

Loda, M., Cukor, B., Tam, S. W., Lavin, P., Fiorentino, M., Draetta, G. F., Jessup, J. M. and Pagano, M. (1997). Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med* **3**, 231-4.

Long, J. J., Leresche, A., Kriwacki, R. W. and Gottesfeld, J. M. (1998). Repression of TFIIH transcriptional activity and TFIIH-associated cdk7 kinase activity at mitosis. *Mol Cell Biol* **18**, 1467-76.

Lozzio, B. B. and Lozzio, C. B. (1977). Properties of the K562 cell line derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer* **19**, 136.

Lozzio, C. B. and Lozzio, B. B. (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* **45**, 321-34.

Lu, X., Toki, T., Konishi, I., Nikaido, T. and Fujii, S. (1998). Expression of p21WAF1/CIP1 in adenocarcinoma of the uterine cervix: a possible immunohistochemical marker of a favorable prognosis. *Cancer* **82**, 2409-17.

Lu, Y., Tatsuka, M., Takebe, H. and Yagi, T. (2000). Involvement of cyclin-dependent kinases in doxorubicin-induced apoptosis in human tumor cells. *Mol Carcinog* **29**, 1-7.

Macaulay, C., Meier, E. and Forbes, D. J. (1995). Differential mitotic phosphorylation of proteins of the nuclear pore complex. *J Biol Chem* **270**, 254-62.

Magnaghi, P., Roberts, C., Lorain, S., Lipinski, M. and Scambler, P. J. (1998). HIRA, a mammalian homologue of Saccharomyces cerevisiae transcriptional co-repressors, interacts with Pax3. *Nat Genet* **20**, 74-7.

Magnaghi-Jaulin, L., Groisman, R., Naguibneva, I., Robin, P., Lorain, S., Le Villain, J. P., Troalen, F., Trouche, D. and Harel-Bellan, A. (1998). Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature* **391**, 601-5.

Mahon, F. X., Deininger, M. W., Schultheis, B., Chabrol, J., Reiffers, J., Goldman, J. M. and Melo, J. V. (2000). Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood* **96**, 1070-9.

Mahyar-Roemer, M. and Roemer, K. (2001). p21 Waf1/Cip1 can protect human colon carcinoma cells against p53-dependent and p53-independent apoptosis induced by natural chemopreventive and therapeutic agents. *Oncogene* **20**, 3387-98.

Malkowicz, S. B., Tomaszewski, J. E., Linnenbach, A. J., Cangiano, T. A., Maruta, Y. and McGarvey, T. W. (1996). Novel p21WAF1/CIP1 mutations in superficial and invasive transitional cell carcinomas. *Oncogene* **13**, 1831-7.

Malumbres, M. and Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* **30**, 630-41.

Malumbres, M. and Carnero, A. (2003). Cell cycle deregulation: a common motif in cancer. *Prog Cell Cycle Res* **5**, 5-18.

Malumbres, M., Sotillo, R., Santamaria, D., Galan, J., Cerezo, A., Ortega, S., Dubus, P. and Barbacid, M. (2004). Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell* **118**, 493-504.

Mao, D. Y., Watson, J. D., Yan, P. S., Barsyte-Lovejoy, D., Khosravi, F., Wong, W. W., Farnham, P. J., Huang, T. H. and Penn, L. Z. (2003). Analysis of Myc bound loci identified by CpG island arrays shows that Max is essential for Myc-dependent repression. *Curr Biol* **13**, 882-6.

Marchenko, N. D., Wolff, S., Erster, S., Becker, K. and Moll, U. M. (2007). Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation. *Embo J* **26**, 923-34.

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**, 16202-12.

Martelli, A. M., Nyakern, M., Tabellini, G., Bortul, R., Tazzari, P. L., Evangelisti, C. and Cocco, L. (2006). Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. *Leukemia* **20**, 911-28.

Martin, A., Odajima, J., Hunt, S. L., Dubus, P., Ortega, S., Malumbres, M. and Barbacid, M. (2005). Cdk2 is dispensable for cell cycle inhibition and tumor suppression mediated by p27(Kip1) and p21(Cip1). *Cancer Cell* **7**, 591-8.

Martin, S. J., Lennon, S. V., Bonham, A. M. and Cotter, T. G. (1990). Induction of apoptosis (programmed cell death) in human leukemic HL-60 cells by inhibition of RNA or protein synthesis. *J Immunol* **145**, 1859-67.

Martin-Caballero, J., Flores, J. M., Garcia-Palencia, P. and Serrano, M. (2001). Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice. *Cancer Res* **61**, 6234-8.

Massague, J. (2004). G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* **432**, 298-306.

Masui, Y. and Markert, C. L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* **177**, 129-45.

Matsushime, H., Ewen, M. E., Strom, D. K., Kato, J. Y., Hanks, S. K., Roussel, M. F. and Sherr, C. J. (1992). Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell* **71**, 323-34.

Matsushime, H., Quelle, D. E., Shurtleff, S. A., Shibuya, M., Sherr, C. J. and Kato, J. Y. (1994). D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **14**, 2066-76.

Matsushime, H., Roussel, M. F., Ashmun, R. A. and Sherr, C. J. (1991). Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* **65**, 701-13.

McGahon, A., Bissonnette, R., Schmitt, M., Cotter, K. M., Green, D. R. and Cotter, T. G. (1994). BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. *Blood* **83**, 1179-87.

McKenzie, K. E., Siva, A., Maier, S., Runnebaum, I. B., Seshadri, R. and Sukumar, S. (1997). Altered WAF1 genes do not play a role in abnormal cell cycle regulation in breast cancers lacking p53 mutations. *Clin Cancer Res* **3**, 1669-73.

McShea, A., Samuel, T., Eppel, J. T., Galloway, D. A. and Funk, J. O. (2000). Identification of CIP-1-associated regulator of cyclin B (CARB), a novel p21-binding protein acting in the G2 phase of the cell cycle. *J Biol Chem* **275**, 23181-6.

Mendrysa, S. M., O'Leary, K. A., McElwee, M. K., Michalowski, J., Eisenman, R. N., Powell, D. A. and Perry, M. E. (2006). Tumor suppression and normal aging in mice with constitutively high p53 activity. *Genes Dev* **20**, 16-21.

Mendrysa, S. M. and Perry, M. E. (2006). Tumor suppression by p53 without accelerated aging: just enough of a good thing? *Cell Cycle* **5**, 714-7.

Michel, J. J. and Xiong, Y. (1998). Human CUL-1, but not other cullin family members, selectively interacts with SKP1 to form a complex with SKP2 and cyclin A. *Cell Growth Differ* **9**, 435-49.

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**, 577-90.

Mitra, J., Dai, C. Y., Somasundaram, K., El-Deiry, W. S., Satyamoorthy, K., Herlyn, M. and Enders, G. H. (1999). Induction of p21(WAF1/CIP1) and inhibition of Cdk2 mediated by the tumor suppressor p16(INK4a). *Mol Cell Biol* **19**, 3916-28.

Moberg, K., Starz, M. A. and Lees, J. A. (1996). E2F-4 switches from p130 to p107 and pRB in response to cell cycle reentry. *Mol Cell Biol* **16**, 1436-49.

Moll, U. M., Marchenko, N. and Zhang, X. K. (2006). p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction. *Oncogene* **25**, 4725-43.

Montes de Oca Luna, R., Wagner, D. S. and Lozano, G. (1995). Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature* **378**, 203-6.

Munoz-Alonso, M. J., Acosta, J. C., Richard, C., Delgado, M. D., Sedivy, J. and Leon, J. (2005). p21Cip1 and p27Kip1 induce distinct cell cycle effects and differentiation programs in myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* **280**, 18120-9.

Murphy, M., Ahn, J., Walker, K. K., Hoffman, W. H., Evans, R. M., Levine, A. J. and George, D. L. (1999). Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev* **13**, 2490-501.

Murray, A. W. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* **116**, 221-34.

Nakamura, S., Roth, J. A. and Mukhopadhyay, T. (2000). Multiple lysine mutations in the C-terminal domain of p53 interfere with MDM2-dependent protein degradation and ubiquitination. *Mol Cell Biol* **20**, 9391-8.

Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y. A., Matsumoto, M., Nakamichi, I., Kitagawa, K., Shirane, M., Tsunematsu, R., Tsukiyama, T., Ishida, N. et al. (2000). Targeted

disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *Embo J* **19**, 2069-81.

Niculescu, A. B., 3rd, Chen, X., Smeets, M., Hengst, L., Prives, C. and Reed, S. I. (1998). Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol* **18**, 629-43.

Noda, A., Ning, Y., Venable, S. F., Pereira-Smith, O. M. and Smith, J. R. (1994). Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* **211**, 90-8.

Nurse, P. (1975). Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature* **256**, 547-51.

Nurse, P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* **344**, 503-8.

Ogawa, K., Tashima, M., Toi, T., Sawai, H., Sawada, H., Fujita, J., Maruyama, Y. and Okuma, M. (1994). Inhibition of erythroid differentiation by stem cell factor in K562 cells expressing the c-kit gene. *Exp Hematol* **22**, 45-51.

Ogawa, M., Onoda, N., Maeda, K., Kato, Y., Nakata, B., Kang, S. M., Sowa, M. and Hirakawa, K. (2001). A combination analysis of p53 and p21 in gastric carcinoma as a strong indicator for prognosis. *Int J Mol Med* **7**, 479-83.

Ohtoshi, A., Maeda, T., Higashi, H., Ashizawa, S. and Hatakeyama, M. (2000). Human p55(CDC)/Cdc20 associates with cyclin A and is phosphorylated by the cyclin A-Cdk2 complex. *Biochem Biophys Res Commun* **268**, 530-4.

Olah, E., Csokay, B., Prajda, N., Kote-Jarai, Z., Yeh, Y. A. and Weber, G. (1996). Molecular mechanisms in the antiproliferative action of taxol and tiazofurin. *Anticancer Res* **16**, 2469-77.

Olivier, M., Eeles, R., Hollstein, M., Khan, M. A., Harris, C. C. and Hainaut, P. (2002). The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* **19**, 607-14.

Ookata, K., Hisanaga, S., Bulinski, J. C., Murofushi, H., Aizawa, H., Itoh, T. J., Hotani, H., Okumura, E., Tachibana, K. and Kishimoto, T. (1995). Cyclin B interaction with microtubule-associated protein 4 (MAP4) targets p34cdc2 kinase to microtubules and is a potential regulator of M-phase microtubule dynamics. *J Cell Biol* **128**, 849-62.

Oren, M. and Levine, A. J. (1983). Molecular cloning of a cDNA specific for the murine p53 cellular tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 56-9.

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

Osada, M., Ohba, M., Kawahara, C., Ishioka, C., Kanamaru, R., Katoh, I., Ikawa, Y., Nimura, Y., Nakagawara, A., Obinata, M. et al. (1998). Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. *Nat Med* **4**, 839-43.

Osheroff, N. (1989). Effect of antineoplastic agents on the DNA cleavage/religation reaction of eukaryotic topoisomerase II: inhibition of DNA religation by etoposide. *Biochemistry* **28**, 6157-60.

Pan, Z. Q., Reardon, J. T., Li, L., Flores-Rozas, H., Legerski, R., Sancar, A. and Hurwitz, J. (1995). Inhibition of nucleotide excision repair by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *J Biol Chem* **270**, 22008-16.

Papst, P. J., Sugiyama, H., Nagasawa, M., Lucas, J. J., Maller, J. L. and Terada, N. (1998). Cdc2-cyclin B phosphorylates p70 S6 kinase on Ser411 at mitosis. *J Biol Chem* **273**, 15077-84.

Parisi, T., Beck, A. R., Rougier, N., McNeil, T., Lucian, L., Werb, Z. and Amati, B. (2003). Cyclins E1 and E2 are required for endoreplication in placental trophoblast giant cells. *Embo J* **22**, 4794-803.

Parsons, R., Li, G. M., Longley, M. J., Fang, W. H., Papadopoulos, N., Jen, J., de la Chapelle, A., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. and Modrich, P. (1993). Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell* **75**, 1227-36.

Patino-Garcia, A., Sotillo-Pineiro, E. and Sierrasesumaga-Ariznabarreta, L. (1998). p21WAF1 mutation is not a predominant alteration in pediatric bone tumors. *Pediatr Res* **43**, 393-5.

Pavletich, N. P. (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* **287**, 821-8.

Pearson, M., Carbone, R., Sebastiani, C., Cioce, M., Fagioli, M., Saito, S., Higashimoto, Y., Appella, E., Minucci, S., Pandolfi, P. P. et al. (2000). PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* **406**, 207-10.

Perkins, N. D. (2002). Not just a CDK inhibitor: regulation of transcription by p21(WAF1/CIP1/SDI1). *Cell Cycle* **1**, 39-41.

Peter, M., Nakagawa, J., Doree, M., Labbe, J. C. and Nigg, E. A. (1990a). Identification of major nucleolar proteins as candidate mitotic substrates of cdc2 kinase. *Cell* **60**, 791-801.

Peter, M., Nakagawa, J., Doree, M., Labbe, J. C. and Nigg, E. A. (1990b). In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* **61**, 591-602.

Petersen, B. O., Lukas, J., Sorensen, C. S., Bartek, J. and Helin, K. (1999). Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *Embo J* **18**, 396-410.

Petitjean, A., Achatz, M. I., Borresen-Dale, A. L., Hainaut, P. and Olivier, M. (2007a). TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* **26**, 2157-65.

Petitjean, A., Mathe, E., Kato, S., Ishioka, C., Tavtigian, S. V., Hainaut, P. and Olivier, M. (2007b). Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* **28**, 622-629.

Pines, J. and Hunter, T. (1990). Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature* **346**, 760-3.

Polyak, K., Lee, M. H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J. M., Tempst, P. and Massague, J. (1994). Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* **78**, 59-66.

Polyak, K., Waldman, T., He, T. C., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1996). Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest. *Genes Dev* **10**, 1945-52.

Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature* **389**, 300-5.

Poole, A. J., Heap, D., Carroll, R. E. and Tyner, A. L. (2004a). Tumor suppressor functions for the Cdk inhibitor p21 in the mouse colon. *Oncogene* **23**, 8128-34.

Poole, J. C., Thain, A., Perkins, N. D. and Roninson, I. B. (2004b). Induction of transcription by p21Waf1/Cip1/Sdi1: role of NFkappaB and effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Cell Cycle* **3**, 931-40.

Prives, C. and Hall, P. A. (1999). The p53 pathway. *J Pathol* **187**, 112-26.

Purdie, C. A., Harrison, D. J., Peter, A., Dobbie, L., White, S., Howie, S. E., Salter, D. M., Bird, C. C., Wyllie, A. H., Hooper, M. L. et al. (1994). Tumour incidence, spectrum and ploidy in mice with a large deletion in the p53 gene. *Oncogene* **9**, 603-9.

Quesnel, B., Preudhomme, C., Lepelley, P., Hetuin, D., Vanrumbeke, M., Bauters, F., Velu, T. and Fenaux, P. (1996). Transfer of p16inka/CDKN2 gene in leukaemic cell lines inhibits cell proliferation. *Br J Haematol* **95**, 291-8.

Ragimov, N., Krauskopf, A., Navot, N., Rotter, V., Oren, M. and Aloni, Y. (1993). Wild-type but not mutant p53 can repress transcription initiation in vitro by interfering with the binding of basal transcription factors to the TATA motif. *Oncogene* **8**, 1183-93.

Ravizza, R., Gariboldi, M. B., Passarelli, L. and Monti, E. (2004). Role of the p53/p21 system in the response of human colon carcinoma cells to Doxorubicin. *BMC Cancer* **4**, 92.

Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H. and Reed, S. I. (1994). Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol* **14**, 1669-79.

Ritke, M. K., Rusnak, J. M., Lazo, J. S., Allan, W. P., Dive, C., Heer, S. and Yalowich, J. C. (1994). Differential induction of etoposide-mediated apoptosis in human leukemia HL-60 and K562 cells. *Mol Pharmacol* **46**, 605-11.

Rodriguez, M. S., Desterro, J. M., Lain, S., Lane, D. P. and Hay, R. T. (2000). Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* **20**, 8458-67.

Rodriguez-Vilarrupla, A., Diaz, C., Canela, N., Rahn, H. P., Bachs, O. and Agell, N. (2002). Identification of the nuclear localization signal of p21(cip1) and consequences of its mutation on cell proliferation. *FEBS Lett* **531**, 319-23.

Rodriguez-Vilarrupla, A., Jaumot, M., Abella, N., Canela, N., Brun, S., Diaz, C., Estanyol, J. M., Bachs, O. and Agell, N. (2005). Binding of calmodulin to the carboxy-terminal region of p21 induces nuclear accumulation via inhibition of protein kinase C-mediated phosphorylation of Ser153. *Mol Cell Biol* **25**, 7364-74.

Roninson, I. B. (2002). Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett* **179**, 1-14.

Rouault, J. P., Falette, N., Guehenneux, F., Guillot, C., Rimokh, R., Wang, Q., Berthet, C., Moyret-Lalle, C., Savatier, P., Pain, B. et al. (1996). Identification of BTG2, an antiproliferative p53-dependent component of the DNA damage cellular response pathway. *Nat Genet* **14**, 482-6.

Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Patten, A. K., Massague, J. and Pavletich, N. P. (1996). Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* **382**, 325-31.

Sage, J., Mulligan, G. J., Attardi, L. D., Miller, A., Chen, S., Williams, B., Theodorou, E. and Jacks, T. (2000). Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G(1) control and immortalization. *Genes Dev* **14**, 3037-50.

Sakaguchi, K., Herrera, J. E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C. W. and Appella, E. (1998). DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev* **12**, 2831-41.

Sakaguchi, K., Saito, S., Higashimoto, Y., Roy, S., Anderson, C. W. and Appella, E. (2000). Damage-mediated phosphorylation of human p53 threonine 18 through a cascade mediated by a casein 1-like kinase. Effect on Mdm2 binding. *J Biol Chem* **275**, 9278-83.

Sakaguchi, K., Sakamoto, H., Xie, D., Erickson, J. W., Lewis, M. S., Anderson, C. W. and Appella, E. (1997). Effect of phosphorylation on tetramerization of the tumor suppressor protein p53. *J Protein Chem* **16**, 553-6.

Sansome, C., Zaika, A., Marchenko, N. D. and Moll, U. M. (2001). Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria. Detection by immunofluorescence on whole cells. *FEBS Lett* **488**, 110-5.

Santoro, I. M. and Groden, J. (1997). Alternative splicing of the APC gene and its association with terminal differentiation. *Cancer Res* **57**, 488-94.

Sax, J. K., Fei, P., Murphy, M. E., Bernhard, E., Korsmeyer, S. J. and El-Deiry, W. S. (2002). BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat Cell Biol* **4**, 842-9.

Schmale, H. and Bamberger, C. (1997). A novel protein with strong homology to the tumor suppressor p53. *Oncogene* **15**, 1363-7.

Schroy, P. C., 3rd, Brown-Shimer, S., Kim, K., Johnson, K. A., Murnane, M. J., Yang, S., O'Brien, M. J., Carney, W. P. and Kupchik, H. Z. (1995). Detection of p21ras mutations in colorectal adenomas and carcinomas by enzyme-linked immunosorbent assay. *Cancer* **76**, 201-9.

Senoo, M., Seki, N., Ohira, M., Sugano, S., Watanabe, M., Inuzuka, S., Okamoto, T., Tachibana, M., Tanaka, T., Shinkai, Y. et al. (1998). A second p53-related protein, p73L, with high homology to p73. *Biochem Biophys Res Commun* **248**, 603-7.

Seoane, J., Le, H. V. and Massague, J. (2002). Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* **419**, 729-34.

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**, 704-7.

Seto, E., Usheva, A., Zambetti, G. P., Momand, J., Horikoshi, N., Weinmann, R., Levine, A. J. and Shenk, T. (1992). Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 12028-32.

Sheaff, R. J., Singer, J. D., Swanger, J., Smitherman, M., Roberts, J. M. and Clurman, B. E. (2000). Proteasomal turnover of p21Cip1 does not require p21Cip1 ubiquitination. *Mol Cell* **5**, 403-10.

Shen, W. F., Detmer, K., Mathews, C. H., Hack, F. M., Morgan, D. A., Largman, C. and Lawrence, H. J. (1992). Modulation of homeobox gene expression alters the phenotype of human hematopoietic cell lines. *Embo J* **11**, 983-9.

Sherr, C. J. and Roberts, J. M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* **9**, 1149-63.

Sherr, C. J. and Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**, 1501-12.

Sherr, C. J. and Roberts, J. M. (2004). Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* **18**, 2699-711.

Shibue, T., Suzuki, S., Okamoto, H., Yoshida, H., Ohba, Y., Takaoka, A. and Taniguchi, T. (2006). Differential contribution of Puma and Noxa in dual regulation of p53-mediated apoptotic pathways. *Embo J* **25**, 4952-62.

Shibue, T., Takeda, K., Oda, E., Tanaka, H., Murasawa, H., Takaoka, A., Morishita, Y., Akira, S., Taniguchi, T. and Tanaka, N. (2003). Integral role of Noxa in p53-mediated apoptotic response. *Genes Dev* **17**, 2233-8.

Shieh, S. Y., Ikeda, M., Taya, Y. and Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* **91**, 325-34.

Shieh, S. Y., Taya, Y. and Prives, C. (1999). DNA damage-inducible phosphorylation of p53 at N-terminal sites including a novel site, Ser20, requires tetramerization. *Embo J* **18**, 1815-23.

Shin, B. A., Ahn, K. Y., Kook, H., Koh, J. T., Kang, I. C., Lee, H. C. and Kim, K. K. (2001). Overexpressed human RAD50 exhibits cell death in a p21(WAF1/CIP1)-dependent manner: its potential utility in local gene therapy of tumor. *Cell Growth Differ* **12**, 243-54.

Shiohara, M., el-Deiry, W. S., Wada, M., Nakamaki, T., Takeuchi, S., Yang, R., Chen, D. L., Vogelstein, B. and Koeffler, H. P. (1994). Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies. *Blood* **84**, 3781-4.

Shivji, M. K., Grey, S. J., Strausfeld, U. P., Wood, R. D. and Blow, J. J. (1994). Cip1 inhibits DNA replication but not PCNA-dependent nucleotide excision-repair. *Curr Biol* **4**, 1062-8.

Shiyanov, P., Bagchi, S., Adami, G., Kokontis, J., Hay, N., Arroyo, M., Morozov, A. and Raychaudhuri, P. (1996). p21 Disrupts the interaction between cdk2 and the E2F-p130 complex. *Mol Cell Biol* **16**, 737-44.

Singer, J. D., Gurian-West, M., Clurman, B. and Roberts, J. M. (1999). Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells. *Genes Dev* **13**, 2375-87.

Smith, H. J. and Gokcen, M. (1971). Long-term culture of mouse macrophages. *J Reticuloendothel Soc* **9**, 336-51.

Smits, V. A., Klompmaker, R., Vallenius, T., Rijksen, G., Makela, T. P. and Medema, R. H. (2000). p21 inhibits Thr161 phosphorylation of Cdc2 to enforce the G2 DNA damage checkpoint. *J Biol Chem* **275**, 30638-43.

Snowden, A. W., Anderson, L. A., Webster, G. A. and Perkins, N. D. (2000). A novel transcriptional repression domain mediates p21(WAF1/CIP1) induction of p300 transactivation. *Mol Cell Biol* **20**, 2676-86.

Sohn, D., Essmann, F., Schulze-Osthoff, K. and Janicke, R. U. (2006). p21 blocks irradiation-induced apoptosis downstream of mitochondria by inhibition of cyclin-dependent kinase-mediated caspase-9 activation. *Cancer Res* **66**, 11254-62.

Soussi, T., Caron de Fromentel, C. and May, P. (1990). Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* **5**, 945-52.

Spiekermann, K., Dirschinger, R. J., Schwab, R., Bagrintseva, K., Faber, F., Buske, C., Schnittger, S., Kelly, L. M., Gilliland, D. G. and Hiddemann, W. (2003). The protein tyrosine kinase inhibitor SU5614 inhibits FLT3 and induces growth arrest and apoptosis in AML-derived cell lines expressing a constitutively activated FLT3. *Blood* **101**, 1494-504.

Staversky, R. J., Vitiello, P. F., Gehen, S. C., Helt, C. E., Rahman, A., Keng, P. C. and O'Reilly, M. A. (2006). p21(Cip1/Waf1/Sdi1) protects against hyperoxia by maintaining expression of Bcl-X(L). *Free Radic Biol Med* **41**, 601-9.

Steinman, R. A. and Johnson, D. E. (2000). p21WAF1 prevents down-modulation of the apoptotic inhibitor protein c-IAP1 and inhibits leukemic apoptosis. *Mol Med* **6**, 736-49.

Stephanou, A. and Latchman, D. S. (2005). Opposing actions of STAT-1 and STAT-3. *Growth Factors* **23**, 177-82.

Stewart, Z. A., Mays, D. and Pietenpol, J. A. (1999). Defective G1-S cell cycle checkpoint function sensitizes cells to microtubule inhibitor-induced apoptosis. *Cancer Res* **59**, 3831-7.

Strober, B. E., Dunaief, J. L., Guha and Goff, S. P. (1996). Functional interactions between the hBRM/hBRG1 transcriptional activators and the pRB family of proteins. *Mol Cell Biol* **16**, 1576-83.

Sturm, I., Rau, B., Schlag, P. M., Wust, P., Hildebrandt, B., Riess, H., Hauptmann, S., Dorken, B. and Daniel, P. T. (2006). Genetic dissection of apoptosis and cell cycle control in response of colorectal cancer treated with preoperative radiochemotherapy. *BMC Cancer* **6**, 124.

Sun, L., Wu, S., Coleman, K., Fields, K. C., Humphrey, L. E. and Brattain, M. G. (1994). Autocrine transforming growth factor-beta 1 and beta 2 expression is increased by cell crowding and quiescence in colon carcinoma cells. *Exp Cell Res* **214**, 215-24.

Sunahara, M., Ichimiya, S., Nimura, Y., Takada, N., Sakiyama, S., Sato, Y., Todo, S., Adachi, W., Amano, J. and Nakagawara, A. (1998). Mutational analysis of the p73 gene localized at chromosome 1p36.3 in colorectal carcinomas. *Int J Oncol* **13**, 319-23.

Suzuki, A., Tsutomi, Y., Akahane, K., Araki, T. and Miura, M. (1998). Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP. *Oncogene* **17**, 931-9.

Suzuki, A., Tsutomi, Y., Miura, M. and Akahane, K. (1999). Caspase 3 inactivation to suppress Fas-mediated apoptosis: identification of binding domain with p21 and ILP and inactivation machinery by p21. *Oncogene* **18**, 1239-44.

Takahashi, H., Ichimiya, S., Nimura, Y., Watanabe, M., Furusato, M., Wakui, S., Yatani, R., Aizawa, S. and Nakagawara, A. (1998). Mutation, allelotyping, and transcription analyses of the p73 gene in prostatic carcinoma. *Cancer Res* **58**, 2076-7.

Takemura, G. and Fujiwara, H. (2007). Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog Cardiovasc Dis* **49**, 330-52.

Taules, M., Rodriguez-Vilarrupla, A., Rius, E., Estanyol, J. M., Casanovas, O., Sacks, D. B., Perez-Paya, E., Bachs, O. and Agell, N. (1999). Calmodulin binds to p21(Cip1) and is involved in the regulation of its nuclear localization. *J Biol Chem* **274**, 24445-8.

Thiriet, C. and Hayes, J. J. (2005). Chromatin in need of a fix: phosphorylation of H2AX connects chromatin to DNA repair. *Mol Cell* **18**, 617-22.

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

Trink, B., Okami, K., Wu, L., Sriuranpong, V., Jen, J. and Sidransky, D. (1998). A new human p53 homologue. *Nat Med* **4**, 747-8.

Truant, R., Xiao, H., Ingles, C. J. and Greenblatt, J. (1993). Direct interaction between the transcriptional activation domain of human p53 and the TATA box-binding protein. *J Biol Chem* **268**, 2284-7.

Tsai, L. H., Harlow, E. and Meyerson, M. (1991). Isolation of the human cdk2 gene that encodes the cyclin A- and adenovirus E1A-associated p33 kinase. *Nature* **353**, 174-7.

Tse, W., Meshinchi, S., Alonzo, T. A., Stirewalt, D. L., Gerbing, R. B., Woods, W. G., Appelbaum, F. R. and Radich, J. P. (2004). Elevated expression of the AF1q gene, an MLL fusion partner, is an independent adverse prognostic factor in pediatric acute myeloid leukemia. *Blood* **104**, 3058-63.

Turner, M. J., 3rd, Everman, D. B., Ellington, S. P. and Fields, C. E. (1990). Detection of free radicals during the cellular metabolism of adriamycin. *Free Radic Biol Med* **9**, 415-21.

Tyner, S. D., Venkatachalam, S., Choi, J., Jones, S., Ghebranious, N., Igelmann, H., Lu, X., Soron, G., Cooper, B., Brayton, C. et al. (2002). p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* **415**, 45-53.

Unger, T., Juven-Gershon, T., Moallem, E., Berger, M., Vogt Sionov, R., Lozano, G., Oren, M. and Haupt, Y. (1999). Critical role for Ser20 of human p53 in the negative regulation of p53 by Mdm2. *Embo J* **18**, 1805-14.

Vaque, J. P., Navascues, J., Shiio, Y., Laiho, M., Ajenjo, N., Mauleon, I., Matallanas, D., Crespo, P. and Leon, J. (2005). Myc antagonizes Ras-mediated growth arrest in leukemia cells through the inhibition of the Ras-ERK-p21Cip1 pathway. *J Biol Chem* **280**, 1112-22.

Venkatachalam, S., Shi, Y. P., Jones, S. N., Vogel, H., Bradley, A., Pinkel, D. and Donehower, L. A. (1998). Retention of wild-type p53 in tumors from p53 heterozygous mice: reduction of p53 dosage can promote cancer formation. *Embo J* **17**, 4657-67.

Vidal, M. J., Loganzo, F., Jr., de Oliveira, A. R., Hayward, N. K. and Albino, A. P. (1995). Mutations and defective expression of the WAF1 p21 tumour-suppressor gene in malignant melanomas. *Melanoma Res* **5**, 243-50.

Vigneron, A., Cherier, J., Barre, B., Gamelin, E. and Coqueret, O. (2006). The cell cycle inhibitor p21waf1 binds to the myc and cdc25A promoters upon DNA damage and induces transcriptional repression. *J Biol Chem* **281**, 34742-50.

Villeval, J. L., Pelicci, P. G., Tabilio, A., Titeux, M., Henri, A., Houesche, F., Thomopoulos, P., Vainchenker, W., Garbaz, M., Rochant, H. et al. (1983). Erythroid properties of K562 cells. Effect of hemin, butyrate and TPA induction. *Exp Cell Res* **146**, 428-35.

Villunger, A., Michalak, E. M., Coultas, L., Mullauer, F., Bock, G., Ausserlechner, M. J., Adams, J. M. and Strasser, A. (2003). p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* **302**, 1036-8.

Vogelstein, B., Lane, D. and Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307-10.

Vousden, K. H. and Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* **2**, 594-604.

Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D. and Stillman, B. (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* **369**, 574-8.

Wagner, S. and Roemer, K. (2005). Retinoblastoma protein is required for efficient colorectal carcinoma cell apoptosis by histone deacetylase inhibitors in the absence of p21Waf. *Biochem Pharmacol* **69**, 1059-67.

Waldman, T., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1995). p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res* **55**, 5187-90.

Waldman, T., Lengauer, C., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1996). Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. *Nature* **381**, 713-6.

Wang, L., Wu, Q., Qiu, P., Mirza, A., McGuirk, M., Kirschmeier, P., Greene, J. R., Wang, Y., Pickett, C. B. and Liu, S. (2001). Analyses of p53 target genes in the human genome by bioinformatic and microarray approaches. *J Biol Chem* **276**, 43604-10.

Wang, Y. and Prives, C. (1995). Increased and altered DNA binding of human p53 by S and G2/M but not G1 cyclin-dependent kinases. *Nature* **376**, 88-91.

Wang, Y. A., Elson, A. and Leder, P. (1997). Loss of p21 increases sensitivity to ionizing radiation and delays the onset of lymphoma in atm-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14590-5.

Warbrick, E., Lane, D. P., Glover, D. M. and Cox, L. S. (1995). A small peptide inhibitor of DNA replication defines the site of interaction between the cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1 and proliferating cell nuclear antigen. *Curr Biol* **5**, 275-82.

Weiss, R. H. and Randour, C. J. (2000). The permissive effect of p21(Waf1/Cip1) on DNA synthesis is dependent on cell type: effect is absent in p53-inactive cells. *Cell Signal* **12**, 413-8.

Welcker, M., Lukas, J., Strauss, M. and Bartek, J. (1998). p21WAF1/CIP1 mutants deficient in inhibiting cyclin-dependent kinases (CDKs) can promote assembly of active cyclin D/CDK4(6) complexes in human tumor cells. *Cancer Res* **58**, 5053-6.

Wendt, J., Radetzki, S., von Haefen, C., Hemmati, P. G., Guner, D., Schulze-Osthoff, K., Dorken, B. and Daniel, P. T. (2006). Induction of p21CIP/WAF-1 and G2 arrest by ionizing irradiation impedes caspase-3-mediated apoptosis in human carcinoma cells. *Oncogene* **25**, 972-80.

Wimmel, A., Lucibello, F. C., Sewing, A., Adolph, S. and Muller, R. (1994). Inducible acceleration of G1 progression through tetracycline-regulated expression of human cyclin E. *Oncogene* **9**, 995-7.

Won, K. A., Xiong, Y., Beach, D. and Gilman, M. Z. (1992). Growth-regulated expression of D-type cyclin genes in human diploid fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9910-4.

Wu, C. L., Zukerberg, L. R., Ngwu, C., Harlow, E. and Lees, J. A. (1995). In vivo association of E2F and DP family proteins. *Mol Cell Biol* **15**, 2536-46.

Xiao, Z. X., Ginsberg, D., Ewen, M. and Livingston, D. M. (1996). Regulation of the retinoblastoma protein-related protein p107 by G1 cyclin-associated kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4633-7.

Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. and Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**, 701-4.

Xiong, Y., Menninger, J., Beach, D. and Ward, D. C. (1992). Molecular cloning and chromosomal mapping of CCND genes encoding human D-type cyclins. *Genomics* **13**, 575-84.

Xu, S. Q. and El-Deiry, W. S. (2000). p21(WAF1/CIP1) inhibits initiator caspase cleavage by TRAIL death receptor DR4. *Biochem Biophys Res Commun* **269**, 179-90.

Xu, Y. (2003). Regulation of p53 responses by post-translational modifications. *Cell Death Differ* **10**, 400-3.

Yam, C. H., Ng, R. W., Siu, W. Y., Lau, A. W. and Poon, R. Y. (1999). Regulation of cyclin A-Cdk2 by SCF component Skp1 and F-box protein Skp2. *Mol Cell Biol* **19**, 635-45.

Yamaguchi, H., Chen, J., Bhalla, K. and Wang, H. G. (2004). Regulation of Bax activation and apoptotic response to microtubule-damaging agents by p53 transcription-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* **279**, 39431-7.

Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R. T., Tabin, C., Sharpe, A., Caput, D., Crum, C. et al. (1999). p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* **398**, 714-8.

Yang, C. T., You, L., Yeh, C. C., Chang, J. W., Zhang, F., McCormick, F. and Jablons, D. M. (2000a). Adenovirus-mediated p14(ARF) gene transfer in human mesothelioma cells. *J Natl Cancer Inst* **92**, 636-41.

Yang, F., von Knethen, A. and Brune, B. (2000b). Modulation of nitric oxide-evoked apoptosis by the p53-downstream target p21(WAF1/CIP1). *J Leukoc Biol* **68**, 916-22.

Yang, W., Velcich, A., Lozonschi, I., Liang, J., Nicholas, C., Zhuang, M., Bancroft, L. and Augenlicht, L. H. (2005). Inactivation of p21WAF1/cip1 enhances intestinal tumor formation in Muc2-/- mice. *Am J Pathol* **166**, 1239-46.

Yang, W., Velcich, A., Mariadason, J., Nicholas, C., Corner, G., Houston, M., Edelmann, W., Kucherlapati, R., Holt, P. R. and Augenlicht, L. H. (2001a). p21(WAF1/cip1) is an important determinant of intestinal cell response to sulindac in vitro and in vivo. *Cancer Res* **61**, 6297-302.

Yang, W. C., Mathew, J., Velcich, A., Edelmann, W., Kucherlapati, R., Lipkin, M., Yang, K. and Augenlicht, L. H. (2001b). Targeted inactivation of the p21(WAF1/cip1) gene enhances Apc-initiated tumor formation and the tumor-promoting activity of a Western-style high-risk diet by altering cell maturation in the intestinal mucosal. *Cancer Res* **61**, 565-9.

Yu, Q. and Sicinski, P. (2004). Mammalian cell cycles without cyclin E-CDK2. *Cell Cycle* **3**, 292-5.

Zeman, S. M., Phillips, D. R. and Crothers, D. M. (1998). Characterization of covalent adriamycin-DNA adducts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11561-5.

Zhang, H., Hannon, G. J. and Beach, D. (1994a). p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev* **8**, 1750-8.

Zhang, H., Hannon, G. J., Casso, D. and Beach, D. (1994b). p21 is a component of active cell cycle kinases. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **59**, 21-9.

Zhang, H., Xiong, Y. and Beach, D. (1993). Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Mol Biol Cell* **4**, 897-906.

Zhang, L., Yu, J., Park, B. H., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (2000). Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. *Science* **290**, 989-92.

Zhang, Y. and Xiong, Y. (2001). A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science* **292**, 1910-5.

Zhao, R., Gish, K., Murphy, M., Yin, Y., Notterman, D., Hoffman, W. H., Tom, E., Mack, D. H. and Levine, A. J. (2000). Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev* **14**, 981-93.

Zhao, Y., Chaiswing, L., Velez, J. M., Batinic-Haberle, I., Colburn, N. H., Oberley, T. D. and St Clair, D. K. (2005). p53 translocation to mitochondria precedes its nuclear translocation and targets mitochondrial oxidative defense protein-manganese superoxide dismutase. *Cancer Res* **65**, 3745-50.

Zhou, B. P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M. H. and Hung, M. C. (2001). Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* **3**, 245-52.

Zhu, H., Chang, B. D., Uchiumi, T. and Roninson, I. B. (2002). Identification of promoter elements responsible for transcriptional inhibition of polo-like kinase 1 and topoisomerase IIalpha genes by p21(WAF1/CIP1/SDI1). *Cell Cycle* **1**, 59-66.

Zirbes, T. K., Baldus, S. E., Moenig, S. P., Nolden, S., Kunze, D., Shafizadeh, S. T., Schneider, P. M., Thiele, J., Hoelscher, A. H. and Dienes, H. P. (2000). Prognostic impact of p21/waf1/cip1 in colorectal cancer. *Int J Cancer* **89**, 14-8.