

Mencions i Agraïments

Primerament vull donar les gràcies al Dr Gabriel Gil per la seva confiança des del primer dia en aquest llarg recorregut. Per mi ha estat un honor i una magnífica experiència ser el teu primer becari i créixer juntament amb el teu grup.

Vull fer extensible aquest agraïment al Dr Paco Real, al Dr Antonio García de Herreros, a la Dra Carme de Bolós, a la Dra Clara Francí, al Dr Xavier Mayol, a la Dra Pilar Navarro, al Dr Josep Baulida, a la Dra Anouchka Skoudy, al Dr Roque Bort, a la Dra Inmaculada Hernández, al Dr José Aramburu, al Dr Paco Muñoz i als membres dels seus grups per enriquir uns seminaris on a vegades s'aprenen coses interessants, i per fer d'aquesta Unitat una família tan diversa.

A vosaltres: Francesc, Laia, Oriol, Ramon, Laura, Andrea i Elena "L", gràcies per haver format aquest petit nucli humà que s'entén i que, tot i patir la forja del tracte diari, encara és capaç de disfrutar portes enfora. Ha estat un plaer acompanyar-vos en entrenaments per maratons, cims, festes, birres, curses i expedicions, i ara només voldria que res s'acabés aquí !!

També vull fer extensible aquests agraïments a la Ibane i a l'Elena "K", dues felines que van saber treure les ungles per defensar un inoblidable cap de setmana a la Costa Brava. Sort que em vaig deixar esgarrapar, va ser genial !!

Una part d'aquests dies feliços els dec al Jepi, al Fausto, a l'Annie, a l'Elisabet Chalaux, a la Judit Pujal, a la Txell, al Jordi (UPF), a la Judit Jané, a l'Ariadna, a la Núria Ribas i a la Bàrbara (& friends). Els dies de "justícia" dins el RIA, els "acolorats" partits de vòlei platja, els cims al Puigsacalm i al Pedraforca, les nits de cinema a l'aire lliure, alguna calçotada a Can Rossinyol, la Ruta del Cister per St Joan, la caminada al Congost de Montrebei, les Festes de la Mercè, el Mercat de Música Viva de Vic, el Cap d'Any a Planoles, i moltes aventures inexplicables formaran sempre part dels meus records més entranyables.

Malgrat l'escàndol públic, estic segur que allà on vagi trobaré a faltar les tragicòmiques discussions Dani-Marta, l'angelical Raquel (amb qui a altes hores de la nit és fàcil compartir "instants màgics" al laboratori ;-), el *savoir faire* de l'Anna Merloç, la visió pragmàtica de la Peiró i l'encantadora Luisa de "Ciavezzzzz".

Vull fer una menció especial als "pilots i copilots" d'aquesta tesi. A vosaltres Jepi, Carine i Joan us agraeixo bastant més que unes quantes hores al volant i molts km per l'A2. Malgrat les inundacions, cues i retencions heu fet de mi un turista segur i afortunat al vostre costat.

De fa molts anys cada aventura bicisàdica és un salt al desconegut i un manantial de sensacions inoblidables. Aquest treball doncs, també és dels Bicisàdics, ja que d'ells he extirpat el temps i molts caps de setmana irrecuperables. (Ho sento nois,...la veritat és que la ciclina no és fluorescent, ni en podem fer samarretes !!)

Dedico aquesta tesi a tota la meva família, mirada des del darrera i des del davant, de dalt i des de baix, des de l'esquerra i des de la dreta.

L'ACTIVADOR DE CDK2 RELACIONAT AMB L'APOPTOSI

**Tesi inscrita al programa de doctorat en
Ciències de la Salut i de la Vida,
Universitat Pompeu Fabra**



**L'ACTIVADOR DE CDK2 RELACIONAT AMB L' APOPTOSI:
CLONATGE I ESTUDI BIOQUÍMIC DEL SEU PAPER
REGULADOR DE LA MORT CEL·LULAR PROGRAMADA**

Tesi que presenta **Maurici Brunet Roig**
per optar al grau de doctor
pel Departament de Ciències Experimentals i de la Salut,
Universitat Pompeu Fabra



*Dep. Ciències Experimentals i de la Salut
Doctorat en Ciències de la Salut i de la Vida*

Tesi realitzada sota la direcció del **Dr Gabriel Gil Gómez**
a la Unitat de Biologia Cel·lular i Molecular,
Institut Municipal d'Investigació Mèdica



IMAS
Institut Municipal
d'Investigació Mèdica. IMIM

Barcelona, 2006

Maurici Brunet Roig
Doctorand

Dr Gabriel Gil Gómez
Director de tesi

Dipòsit legal: B.7430-2007
ISBN: 978-84-690-3929-8

Anglicismes Freqüents

Background	nivell de fons
Checkpoint	punt de control
Destruction box	caixa de destrucció
Downstream	per avall de..
Feedback loop	retroalimentació
Pool	conjunt
Priming site	lloc encebador
Splicing	processament del DNA per tall i unió
Turnover	recanvi
Upstream	per amunt de..

Abreviatures Freqüents

ARE	elements rics en AU
BER	reparació per escisió de base
cDNA	DNA còpia
C-ter	extrem carboxi-terminal
Cyc O	Ciclina O
DNA	àcid deoxiribonucleic
EST	fragments de DNA expressats i seqüenciats
FACS	selecció cel.lular activada per fluorescència
GST	glutatió-sulfidril-transferasa
h	hora
HA	hemaglutinina
IR	radiació ionitzant
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
KO	deficient
mA	miliAmpers
MBP	proteïna d'unió a la maltosa
min	minut
mRNA	RNA missatger
NER	reparació per escisió de nucleòtid
NES	seqüència d'export nuclear
NLS	seqüència de localització nuclear
N-ter	extrem amino-terminal
O/N	tota la nit
pb	parell de bases
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
ROS	espècies reactives de l'oxigen
RNA	àcid ribonucleic
RT-PCR	transcripció reversa-PCR
SNC	sistema nerviós central
tRNA	RNA de transferència
UTR	regió no traduïda
UV	ultravioleta
v	volts
WT	salvatge

I. Introducció General.....	17
1 Introducció al cycle cel.lular.....	19
1.1 La subunitat cdk.....	19
1.2 La subunitat ciclina.....	20
1.3 Activació de la cdk per interacció amb la ciclina.....	22
1.4 Activació del complex cdk-ciclina per fosforilació.....	22
1.5 Inhibició del complex cdk-ciclina per fosforilació.....	23
1.6 Inhibició del complex cdk-ciclina per cdki.....	23
1.7 Inici del cycle cel.lular i dependència de factors externs.....	24
1.8 Transició G1-S.....	25
1.9 Transició G2-M.....	28
1.10 Degradació de les Ciclines.....	29
2 Introducció als checkpoints del cycle cel.lular.....	30
2.1 Reclutament d'ATM, ATR i DNA-PK als punts de dany al DNA.....	30
2.2 Activació dels checkpoints dependents de Chk1 i Chk2.....	32
2.3 Dualitat entre Chk1/Chk2.....	34
2.4 Activació dels checkpoints dependents de p53.....	34
2.5 E2F1 com a diana d'ATM/ATR.....	35
2.6 H2AX com a marcador del dany al DNA.....	36
3 Introducció a l'apoptosi.....	36
3.1 Caspases.....	36
3.2 Apoptosoma.....	37
3.3 La família Bcl-2.....	38
3.4 Fagocitosis cel.lular.....	39
3.5 Degradació del DNA.....	40
3.6 Via extrínseca de transducció de senyals en apoptosi.....	40
4 Cycle cel.lular i apoptosi.....	41
4.1 Cdk2 i apoptosi.....	41
4.2 p27 ^{Kip1} i apoptosi.....	42
4.3 p53 i Cdk2.....	42
4.4 Bax i Bcl-2.....	42
4.5 Posicionament de Cdk2 en l'apoptosi de timòcits.....	43
II. Objectius.....	45
III. Materials i Mètodes Generals.....	49
1 Tècniques de Biologia Molecular.....	51
2 Clonatge de la Ciclina O i la Ciclina I.....	51
3 Seqüenciació.....	51
4 Transfeccions transitòries.....	51
5 Comptatge de cèl.lules adherides i flotants.....	52
6 Microscopia òptica confocal i de fluorescència.....	52
7 Generació de clons estables en cèl.lules HEK293.....	52
8 Cultiu i generació de clons induïbles tet/ON en cèl.lules Baf3.....	53
9 Obtenció i cultiu primari de cèl.lules MEF de ratolí.....	54

10	Obtenció i cultiu primari de Timòcits	55
11	Citometria de flux	55
12	Aïllament de RNA	55
13	RT-PCR	56
14	<i>Southern Blotting</i>	56
15	Producció de proteïnes recombinants	57
16	Purificació de proteïnes recombinants	58
17	Assajos de <i>Pull-Down</i>	58
18	Immunoprecipitació / Assaig Kinasa	59
19	Assajos d'activitat fosfatasa	59
20	Assajos d'activitat GSK3 β	60
21	Obtenció d'anticossos policlonals de conill	60
21.1	Purificació de l'anticòs policlonal anti-Ciclina O	61
21.2	Conjugació del pèptid C1 a KLH (amb MBS)	62
21.3	Conjugació del pèptid N1 a KLH (amb Glutaraldehyd)	62
21.4	Purificació dels anticossos policlonals anti-N1 i anti-C1	63
22	ELISA	63
22.1	Conjugació dels pèptids C1 i N1 a Ovalbúmina	63
22.2	Adsorció	63
22.3	Hibridació	64
23	Electroforesi desnaturalitzant i <i>Western Blotting</i>	64
23.1	Preparació de les mostres	64
23.2	Transferència	64
23.3	Hibridació	64
24	Immunohistoquímica (IHC)	65
24.1	Preparació dels teixits	65
24.2	Incubació	65
25	Informació suplementària	67
IV. Capítols Temàtics		71
Capítol 1. Identificació <i>in silico</i> i clonatge de la Cyclina O		75
1	Resultats	75
1.1	Identificació <i>in silico</i> d'una nova ciclina	75
1.2	Clonatge de la Cyclina O	77
1.3	Identificació de diferents variants transcripcionals de la Cyclina O en ratolí	80
1.4	Estudi del promotor de la Cyclina O	81
2	Discussió	83
2.1	cDNA β i γ	83
2.2	cDNA δ	83
Capítol 2. Efectes de la Cyclina O en el cycle cel.lular i l'apoptosi		89
1	Resultats	89
1.1	Formació i activació del complex Cdk2-Cyclina O <i>in vitro</i>	89
1.2	Localització nuclear i citoplasmàtica de la Cyclina O	93
1.3	Inducció de l'apoptosi per sobreexpressió de la Cyclina O	95

1.4 Alteració del cicle cel.lular per la Ciclina O.....	97
1.5 Efecte protector i alteració de l'activació de p53 per la Ciclina O.....	101
2 Discussió	105
2.1 Formació del complex Ciclina O-Cdk2 <i>in vitro</i>	105
2.2 Localització nuclear i/o citoplasmàtica de Ciclina O	105
2.3 Obtenció de clons amb expressió constitutiva de la Ciclina O	106
2.4 Alteració de la fase S per l'expressió de Ciclina O	107
2.5 Alteració del <i>checkpoint</i> de la fase G2 per l'expressió de Ciclina O	110
2.6 Efecte <i>antiapoptòtic</i> de la Ciclina O <i>upstream</i> d'ATM?	111
2.7 Efecte apoptòtic de la Ciclina O <i>upstream</i> d'ATM.....	112
2.8 Redundància de la Ciclina D2 i Ciclina O en absència d'IL3	113
Capítol 3. Regulació de la Ciclina O	117
1A Introducció a la regulació transcripcional	117
1.1 Introducció al supressor tumoral p53.....	117
1.2 p53 i apoptosi	121
1.3 p53 i els <i>checkpoints</i> de cicle cel.lular	124
1.4 p53 i la reparació del DNA	125
1B Introducció a la regulació postranscripcional.....	127
1.1 Regulació al 5'UTR de l'mRNA	127
1.2 Regulació al 3'UTR de l'mRNA.....	127
1C Introducció a la regulació postraduccional.....	130
1.1 Degradació de les ciclines.....	130
1.2 Introducció a GSK3.....	130
1.3 Regulació de l'estabilitat de la Ciclina D1 per GSK3	130
1.4 Regulació de la síntesi i l'estabilitat de la Ciclina D1 per Ras.....	131
1.5 Translocació nucleo-citoplasmàtica de la Ciclina D1 per GSK3.....	131
1.6 Degradació proteasomal per poli-ubiquitinació	132
1.7 Regulació de l'estabilitat de la Ciclina E a través de Cdk2, GSK3 i Fbw7	132
1.8 Regulació de l'activació de p53 per GSK3	133
2A Resultats de la regulació transcripcional de la Ciclina O	135
2.1 Regulació positiva de l'expressió de la Ciclina O per ATM/ATR i p53 <i>in vivo</i>	135
2.2 Baixa expressió de la Ciclina O en teixits adults	136
2B Resultats de la regulació postranscripcional de la Ciclina O.....	138
2.1 Regulació negativa de l'mRNA de la Ciclina O.....	138
2C Resultats de la regulació postranscripcional de la Ciclina O	140
2.1 Autofosforilació de la Ciclina O i fosforilació per GSK3β.....	140
2.2 Estabilització de la Ciclina O per GSK3β	141
2.3 Fluctuació de l'estabilitat i l'activitat de la Ciclina O durant el cicle cel.lular	142

3 Discussió	144
3.1 Funcionalitat de la Cyclina O en els checkpoints dependents de p53	144
3.2 Efecte de la cafeïna en l'expressió de la Cyclina O	145
3.3 Inducció de la Cyclina O per mecanismes postraduccionals de p53	146
3.4 Expressió de la Cyclina O en teixits adults	146
3.5 Inducció de la Cyclina O independent de p53	147
3.6 Regulació de l'estabilitat de l'mRNA de la Cyclina O	147
3.7 Seqüència PEST a la Cyclina O?	149
3.8 Autofosforilació de la Cyclina O	150
3.9 Autofosforilació en Cis o en Trans?	150
3.10 Fosforilació per GSK3	151
3.11 Cyclina O en funció dels factors mitòtics?	152
3.12 Funcionalitat de les fosforilacions sobre la Cyclina O	153
Capítol 4. Expressió de la Cyclina O al timus	159
1 Introducció	159
1.1 Cèl.lules T, receptor TCR i molècules MHC	159
1.2 Mort per negligència, selecció positiva i selecció negativa en timòcits ...	161
1.3 Factors de transcripció en la selecció negativa de timòcits	162
1.4 TCR i bisenyalització	163
1.5 Activació de les MAPK en la selecció positiva i negativa	163
1.6 Formació de diferents complexos TCR en la selecció positiva i negativa	164
1.7 Elements de l'apoptosi de timòcits	165
1.8 Posicionament de Cdk2 en l'apoptosi de timòcits	166
1.9 Apoptosi espontània	167
1.10 L'estroma tímica	168
2 Resultats	171
2.1 Inducció de l'expressió del gen de la Cyclina O en el timus per la pèrdua de l'arquitectura tissular	171
2.2 Inducció de l'expressió de la Cyclina O en timus en l'inici del procés apoptòtic dependent d'irradiació	172
2.3 Increment dels nivells de la Cyclina O en timus i melsa en etapes posteriors a l'apoptosi dependent d'irradiació	173
3 Discussió	175
3.1 Apoptosi espontània i Cyclina O	175
3.2 Artefactes dels cultius <i>in vitro</i>	175
3.3 Importància del contacte cèl.lula-cèl.lula	176
3.4 Cèl.lules mioides i protecció dels timòcits	176
3.5 Oxigenació dels timòcits	177
3.6 Inducció de la Cyclina O <i>in vivo</i> durant l'apoptosi de timòcits	177
3.7 Factors de transcripció inductors de la selecció negativa	179
3.8 Inducció de la Cyclina O <i>in vivo</i> en cèl.lules del timus	180
Capítol 5. Expressió de la Cyclina O a l'intestí prim	183
1 Introducció	183
1.1 Fisiologia de l'intestí prim	183

1.2 Expressió de p53 i p21 ^{Cip1} en l'apoptosi induïda dels enteròcits de ratolí	184
2 Resultats	187
2.1 Localització de la Cyclina O en les vellositats de l'intestí prim	187
2.2 Inducció de la Cyclina O dependent d'irradiació en les criptes de l'intestí prim	187
3 Discussió	189
Capítol 6. Expressió de la Cyclina O al pulmó	193
1 Introducció	193
1.1 Estructura interna del pulmó	193
2 Resultats	195
2.1 Expressió de la Cyclina O en l'epiteli bronquial i als components de les parets alveolars	195
3 Discussió	196
Capítol 7. Expressió de la Cyclina O al testicle	199
1 Introducció	199
1.1 La primera divisió meiótica	199
1.2 La segona divisió meiótica	200
1.3 Introducció a l'espermatogènesi i a l'espermioogènesi	201
1.4 p53 i apoptosi en testicles	205
2 Resultats	207
2.1 Localització de la Cyclina O en testicle	207
2.2 Expressió de la Cyclina O en cèl.lules progenitores dels gàmetes masculins	207
2.3 Expressió de la Cyclina O en els cossos residuals	208
2.4 Expressió de la Cyclina O en els vasos eferents i en les cèl.lules de Leydig	208
3 Discussió	210
Capítol 8. Expressió de la Cyclina O al sistema nerviós central	215
1 Introducció	215
1.1 Funcionalitat del cerebel i les cèl.lules de Purkinje	215
1.2 Desenvolupament del cerebel	216
1.3 Neurogènesi a l'hipocamp	217
2 Resultats	218
2.1 Expressió de la Cyclina O en cerebel, hipocamp i còrtex de ratolí	218
2.2 Inducció de la Cyclina O dependent d'irradiació al sistema nerviós central de ratolí	218

3 Discussió	221
3.1 Apoptosi espontània i induïda al cerebel	221
3.2 Apoptosi a l'hipocamp	222
3.3 ATM i apoptosi neural	222
Capítol 9. Expressió de la Cyclina O en desenvolupament	225
1 Introducció	225
1.1 Activitat transcripcional de p53	225
1.2 Apoptosi dependent i independent de p53	226
2 Resultats	228
2.1 Patró d'expressió de la Cyclina O durant el desenvolupament	228
2.2 Patró de cèl.lules en proliferació en el desenvolupament de l'epidermis, l'aorta dorsal, el cartílag i la zona de les parpelles	231
3 Discussió	234
3.1 Expressió de la Cyclina O al cartílag hialí i en la ossificació endocondrial	234
3.2 Expressió de la Cyclina O al cartílag fibrós	236
3.3 Expressió de la Cyclina O durant la formació del cristal·lí	237
3.4 Expressió de la Cyclina O a l'epidermis	239
3.5 Expressió de la Cyclina O al sistema nerviós perifèric	240
3.6 Expressió de la Cyclina O en epitelis i altres estructures	241
3.7 Activitat de p53 i Cyclina O en desenvolupament	242
3.8 Apoptosi p53 dependent i p53 independent	243
V. DISCUSSIÓ FINAL	245
VI. CONCLUSIONS	255
VII. BIBLIOGRAFIA	259

I. Introducció General

1 Introducció al cicle cel.lular

Tim Hunt i els seus col.laboradors descobriren la primera ciclina l'any 1983 (92). Observant les pujades i baixades dels nivells d'aquesta nova proteïna s'observà que el seu comportament podria estar connectat amb els processos cíclics de divisió cel.lular, suggerint que la seva síntesi podria portar la cèl.lula a la mitosi, i que la seva degradació podria posar fi a un cicle per començar el següent. Anys abans ja s'havia identificat una sèrie de factors que controlaven l'entrada a la mitosi, entre els quals hi havia el gen *cdk1* i l'activitat MPF (*Maturation-Promoting Factor*). La unificació d'aquestes dues aproximacions i la purificació del complex MPF, format per les subunitats Cdk1 i Ciclina B va portar a un model on l'existència d'un oscil.lador autònom pot dirigir el ritme de divisió d'una cèl.lula.

Treballs més tardans han mostrat que hi ha diferents complexos cdk-ciclina que s'activen a diferents fases del cicle cel.lular (G1, S, G2 i M), i que les subunitats ciclins han de ser destruïdes en la sortida de cada fase a través de la proteòlisi mediada pel proteasoma.

Per regular l'inici del cicle cel.lular en funció de la disponibilitat energètica de la cèl.lula són necessaris els complexos Cdk4/6-Ciclina D. A partir d'aquest inici els complexos cdk-ciclina indueixen principalment dos processos en el cicle cel.lular; la duplicació del DNA i els centrosomes durant la interfase, i la mitosi. Estudiant el rol de cada ciclina s'ha vist que els complexos Cdk2-Ciclina E i Cdk2-Ciclina A condueixen la replicació del DNA i la duplicació del centrosoma, els complexos Cdk1-Ciclina A estan implicats en aquests dos processos i també en la mitosi, i els complexos Cdk1-Ciclina B només intervenen en la mitosi.

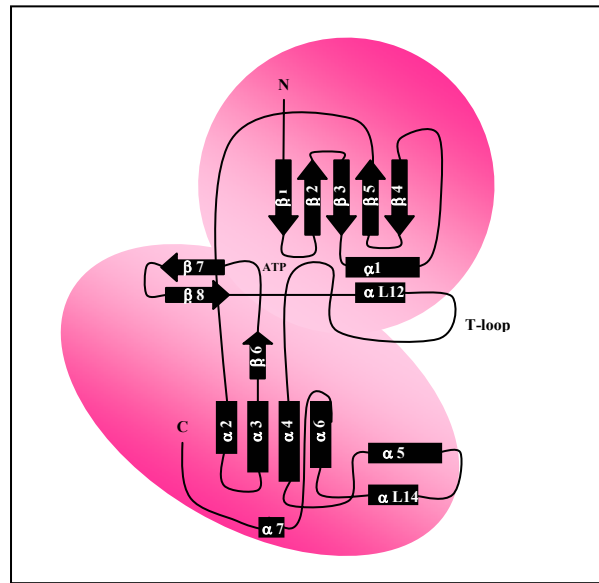
1.1 La subunitat cdk

Les subunitats cdk són serina/treonina kinases d'una massa molecular d'entre 35-40kDa, amb una identitat de seqüència del 40% entre elles i amb capacitat per unir-se i ser activades per les subunitats ciclina. Encara que les cdk més conegudes tenen una funció de control del cicle cel.lular, la llista de proteïnes cdk implicades en altres processos és molt àmplia, ja que la definició de les cdk no inclou limits en la seva funció biològica.

En *S.pombe* hi ha una única subunitat cdk (Cdc2), mentre que en *S.cerevisiae* hi ha tres membres d'aquesta mateixa família (Cdc28, Pho85 i Kin28). En humans el membre fundador va ser Cdk1, però la llista passa per Cdk2 fins a Cdk12, amb una elevada homologia entre elles (40-75% de similitud entre Cdk1-10) (54,228).

La típica subunitat catalítica cdk conté un centre actiu de 300 aminoàcids que és completament inactiu en la seva forma monomèrica i no fosforilada (368). La difracció de raigs X del cristall de Cdk2 mostra com l'estructura d'aquest apoenzím es pot dividir en 2 lòbuls (77,258) (**Esquema 1**). El més petit conté el domini N-ter i està format per una fulla de cadenes β antiparal.leles ($\beta 1$ - $\beta 5$) i una llarga hèlix- α . El lòbul més llarg conté l'extrem C-ter i està format per 4 hèlixs- α desorganitzades, un petita cinta β ($\beta 6$ - $\beta 8$) i dues hèlixs- α ($\alpha 5$, $\alpha 7$). Les regions més conservades entre els diferents membres de la família inclouen un *loop* ric en Gly al lloc d'unió de l'ATP (entre $\beta 1$ i $\beta 2$), un motiu altament conservat amb la seqüència PSTAIRE en l'hèlix $\alpha 1$, i el motiu GDSEID a l'N-ter de l'hèlix- $\alpha 5$. Les regions més divergents entre diferents membres cdk tendeixen a estar relativament distants del centre actiu. El lloc d'unió de l'ATP es troba en la fissura existent entre els dos lòbuls N i C-ter. En aquesta regió es requereix la

presència dels residus Asp145 i Asn132, un ió Mg^{2+} i una molècula d'aigua per mantenir estable la unió dels tres fosfats de l'ATP a través dels seus oxígens (77).



Esquema 1. Diagrama topològic dels elements de l'estructura secundària de Cdk2.

Almenys hi ha dues limitacions estructurals que mantenen la forma inactiva del monòmer cdk. El lloc d'unió del substrat està bloquejat per un loop, anomenat *T-loop* (residus 152-170), i el lloc d'ancoratge dels fosfats de l'ATP, a un *loop* ric en Gly, està orientat de manera que la transferència de fosfats sigui molt ineficient. Malgrat el bloqueig del *T-loop*, la baixa qualitat de la densitat electrònica del cristall de la proteïna Cdk2 en aquesta regió mostra que una porció d'aquest loop (residus 156-162) és altament dinàmic i possiblement flexible en solució (77).

1.2 La subunitat ciclina.

Originalment descrites com a proteïnes els nivells de les quals oscil·len durant el cicle cel·lular (92), actualment són definides com a membres d'una família amb similituds estructurals que uneixen i activen subunitats catalítiques de la família de les cdk.

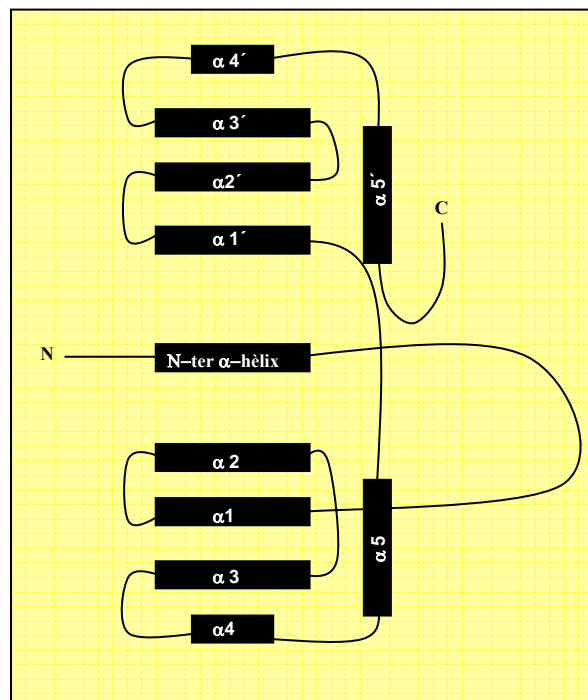
La major part de les ciclines tenen una massa molecular d'entre 30 i 45kDa i comparteixen una regió d'uns 100 residus anomenada *cyclin box* altament conservada (30-50% de similitud entre les Ciclines A, B, D i E) i responsable de la unió i activació de la subunitat cdk, ja que les mutacions en aquesta zona inhibeixen les dues funcions (unió i activació) de manera que una i l'altra són difícilment dissociables (228,279). Cada ciclina s'associa a una o dues subunitats cdk, i la major part d'aquestes es poden unir a una o dues subunitats ciclina, encara que hi ha excepcions com Cdk1 en *S.cerevisiae*, que es pot associar a 9 ciclines diferents. Actualment només Cdk5 sembla incomplir aquestes normes, ja que s'uneix i és activa a través de la unió amb p35, una subunitat reguladora que no pertany a la família de les ciclines (178).

Inicialment descobertes com un parell de ciclines (A i B) que s'associen a una sola subunitat kinasa (Cdk1), la família s'ha expandit fins a contenir múltiples subunitats

ciclina i múltiples subunitats cdk involucrades en activitats tan diverses com el control del cycle cel.lular, la transcripció, la diferenciació i l'*splicing* alternatiu (54,268).

Pel que fa a les ciclins que regulen el cycle cel.lular aquestes es poden agrupar en ciclins de G1 (ciclins D), ciclins de fase S (ciclins E i A) i ciclins mitòtiques (ciclins A i B). Les funcions de les ciclins van estretament lligades a les oscil.lacions dels seus nivells, ja que incrementen o disminueixen en etapes determinades del cycle cel.lular; G1, S o G2/M. Com en les ciclins de llevat, les oscil.lacions en els nivells de les Ciclins D, E, A i B en mamífers reflecteixen clarament els nivells del seu mRNA, i la seva degradació a través de la maquinària proteolítica dependent d'ubiquitina facilita la seva desaparició en el moment precís per començar la fase següent del cycle cel.lular de forma ordenada. Actualment es creu que les ciclins contenen regions que determinen a quin substrat o en quin compartiment subcel.lular pot exercir la seva funció la subunitat cdk. Per tant, la multiplicitat en les ciclins que regulen el cycle cel.lular, té un paper important no només activant la subunitat cdk en el temps i el lloc adients, sinó també en l'especificitat del seu substrat.

El fragment cristal.litzable de la Ciclina A (residus 173-432) mostra una estructura globular amb múltiples hèlixs- α estructurades en dos dominis consecutius i amb plegaments idèntics, de 90 aminoàcids cadascun (residus 208-303 i 309-399) (164). Cada plegament consisteix en un conjunt de tres hèlixs ($\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$) i dues hèlixs addicionals ($\alpha 4$ i $\alpha 5$). Aquesta estructura de 5 hèlixs repetides dues vegades forma el plegament ciclina, i per la seva homologia en la seqüència es creu que pot ser comú a tota la família (**Esquema 2**).



Esquema 2. Diagrama topològic dels elements de l'estructura secundària de la Ciclina A.

La primera repetició coincideix amb la *cyclin box* (residus 209-310), i és indispensable per la interacció amb Cdk2, ja que forma el lloc d'unió amb l'hèlix que conté la seqüència PSTAIRE mantenint un contacte directe amb el *T-loop* i la fulla β N-

ter de Cdk2. Aquesta primera repetició del plegament ciclina té una interacció amb Cdk2 més important que la segona repetició (56% vs 48%).

1.3 Activació de la cdk per interacció amb la ciclina

En l'estructura Ciclina A-Cdk2, la Ciclina A s'uneix a la fenedura catalítica de la Cdk2, de manera que interacciona amb els dos lòbuls formant una gran zona de connexió entre les dues proteïnes (**Esquema 1**). La comparació de l'estructura de Cdk2 lliure (77) amb l'estructura del complex Ciclina A-Cdk2 (164) revela que la Ciclina A altera la conformació de la regió PSTAIRE i del *T-loop* de Cdk2, així com també l'orientació relativa dels seus extrems N i C-ter.

L'alteració de la posició i orientació de la hèlix- $\alpha 1$ que conté la seqüència PSTAIRE està associada a canvis dramàtics en el compactament de la resta de la proteïna. En Cdk2 lliure el compactament és suau, i l'hèlix- $\alpha 1$ es manté posicionada cap a l'interior del centre catalític. En el complex Ciclina A-Cdk2 el grau d'empaquetament és molt més elevat i això permet el moviment lateral i la rotació de l'hèlix. Aquesta rotació fa que l'hèlix es desplaci cap a l'interior de la fenedura catalítica, éssent la zona de més contacte de Cdk2 amb la ciclina i on es donen les interaccions hidrofòbiques. Un conjunt de dades bioquímiques i genètiques mostra que la seqüència PSTAIRE característica de la família cdk és central en aquesta interfase Cdk2-Ciclina, ja que les mutacions en aquesta zona eliminen la interacció.

El *T-loop* de Cdk2, que bloqueja l'entrada al centre catalític, resulta ser també una zona d'interacció amb la ciclina. L'N-ter del *loop* interacciona amb les hèlixs $\alpha 1$, $\alpha 2$ i $\alpha 3$ de la primera repetició de la Ciclina A, al mateix temps que l'hèlix N-ter d'aquesta dirigeix el *T-loop* fora de l'entrada del centre catalític de Cdk2.

A part dels canvis en la regió de PSTAIRE la regió de l'N-ter no és veu significativament alterada per la unió a la ciclina, encara que es mogui en relació al lòbul de l'extrem C-ter.

1.4 Activació del complex cdk-ciclina per fosforilació

A més de la unió a les ciclines, la completa activació de les proteïnes cdk requereix la fosforilació a un residu conservat (Thr161 en Cdk1 i Thr160 en Cdk2) (**Esquema 3**). En el monòmer Cdk2 aquest residu treonina està situat al *T-loop* que bloqueja el centre actiu, però malgrat estar exposat al solvent en més d'un 33% el seu grup hidroxil està orientat cap al lloc d'unió a l'ATP i és inaccessible. Com hem dit, el canvi d'estructura que promou la unió amb la ciclina dirigeix el *T-loop* fora de l'entrada del centre catalític de Cdk2 exposant el grup hidroxil del residu Thr160 fosforilable.

La proteïna CAK (Cdk Activating Kinase) és l'enzim responsable de la fosforilació activadora d'aquest residu incrementant l'activitat de Cdk2 en unes 300 vegades, augmentant l'associació entre la subunitat catalítica i la ciclina (55).

Curiosament, CAK és un enzim multimèric amb una subunitat catalítica de la família cdk i una subunitat reguladora de la família de les ciclines, Cdk7 i Ciclina H. Cdk7 també té un paper en la regulació de la transcripció, ja que és la subunitat kinasa del factor de transcripció general II H (TFIIH) (55).

De la mateixa manera que els substrats de CAK són fosforilats al *T-loop*, el *T-loop* de Cdk7 conté un residu treonina (Thr170) que també ha de ser fosforilat per la seva activació, ja que les mutacions en aquest punt redueixen considerablement la seva activitat. En aquest cas l'activitat no és nul·la degut a la inusual participació d'una

tercera subunitat activadora d'aquest complex cdk-ciclina, Mat1 (Menage à Trois) (207). Mat1 és una proteïna RING finger que estabilitza el complex Cdk7-Ciclina H i coopera *in vivo* en la seva activació juntament amb la fosforilació a la Thr170.

L'enzim CAK és capaç de fosforilar diferents tipus de subunitats cdk en funció del cicle cel·lular (55), i la fosforilació dels residus treonina de Cdk1 i Cdk2 oscil·la de manera paral·lela a la síntesi i degradació de les ciclins, de manera que el més probable és que CAK també requereixi aquesta unió prèvia cdk-ciclina per executar la seva funció.

1.5 Inhibició del complex cdk-ciclina per fosforilació

Hi ha diferents maneres d'inactivar l'activitat kinasa dels complexos cdk-ciclina. Dues de les més òbvies són la dissociació de la subunitat activadora, la ciclina, o la defosforilació de la Thr160/161 (**Esquema 3**). Aquest últim mecanisme encara és poc conegut i no sembla tenir molta importància *in vivo*, tot i que les fosfatases KAP i PP2C són capaces d'aquesta reacció *in vitro* (350). La dissociació o degradació de les ciclins és vital per la regulació de l'activitat de les cdk i per la periodicitat del cicle cel·lular.

Els complexos cdk-ciclina també poden ser inhibits a través d'una tercera via; la fosforilació dels residus Thr14 i Tyr15 prop de l'extrem N-ter de la cdk i situats al sostre del centre actiu, concretament a la regió d'ancoratge de l'ATP. La fosforilació en qualsevol d'aquests dos residus pot inhibir l'activitat kinasa interferint amb la unió al substrat, o afectant l'orientació de l'ATP degut a un canvi en la conformació del *loop* ric en Gly en que es troben. Els residus Thr14 i Tyr15 estan units per ponts d'hidrògen amb la Glu51, i la seva fosforilació també podria afectar la posició dels residus del centre catalític i dels fosfats de l'ATP a través de repulsions electroestàtiques

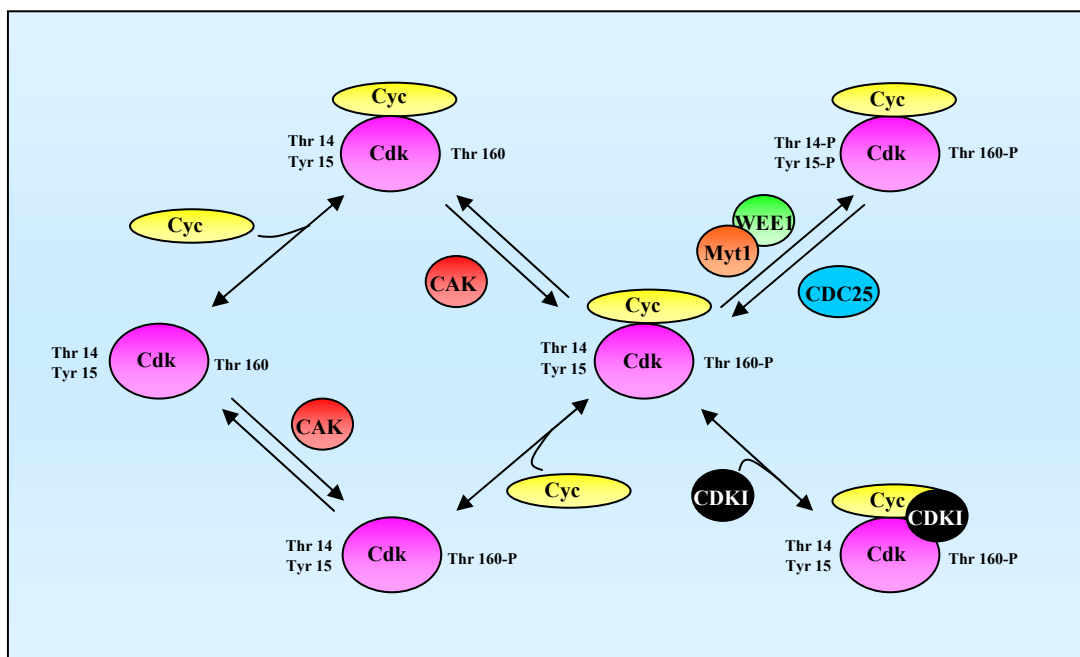
Aquestes fosforilacions inhibidores requereixen la unió prèvia de la subunitat ciclina, ja que ambdós residus estan situats sota el *T-loop* i queden amagats dins el centre actiu. La unió de la ciclina i el moviment del *T-loop* provoca l'exposició d'aquests residus facilitant l'accés als enzims responsables de les seves modificacions postraduccionals.

La kinasa Wee1, originalment identificada en *S.pombe*, és el principal candidat per la fosforilació sobtada d'aquests residus en Cdk1. Tot i que *in vitro* aquesta kinasa pot actuar sobre pèptids amb residus Thr i Tyr, *in vivo* Wee1 només és responsable de la fosforilació sobre Tyr15 i es requereix l'actuació de la kinasa Myt1 per actuar sobre la Thr14. L'activitat de Wee1 disminueix durant la mitosi contribuïnt a l'increment de l'activitat Ciclina B-Cdk1 en aquesta fase. Aquesta inhibició es deu a la degradació de Wee1 a través de l'acció de la kinasa Tome-1 (Trigger of Mitotic Entry), que també media la degradació d'ella mateixa fent que la desaparició de Wee1 sigui només transitòria durant la fase G2 (20).

A la vegada, la fosforilació sobre els residus Thr14 i Tyr15 és contrarestada per la fosfatasa Cdc25. Aquest enzim d'especificitat dual és responsable d'eliminar els fosfats de sobre Thr14 i Tyr15 i activar els complexos cdk-ciclina. Aquest mecanisme de control sembla especialment important en la regulació de Cdk1. Els complexos amb Cdk1-Ciclina B són fosforilats en Thr14, Tyr15 i Thr161 mentre la cèl·lula s'aproxima a la mitosi i al mateix temps que incrementen els nivells de la Ciclina B. D'aquesta manera els nous complexos que es formen es mantenen en un estat inactiu, fins al punt en que els residus Thr14 i Tyr15 són defosforilats al finals de G2. Cdc25 incrementa durant la mitosi a causa de la fosforilació al seu extrem N-ter, suggerint que els complexos Cdk1-Ciclina A podrien ser responsables d'aquesta regulació.

1.6 Inhibició del complex cdk-ciclina per cdk.

Un quart mecanisme de regulació dels complexos cdk-ciclina és a través de la interacció amb els pèptids inhibidors de cdk, cdk_i (338) (**Esquema 3**). Segons la seva estructura i els seus substrats els cdk_i s'han agrupat en dues famílies. Una família inclou els INK4 (Inhibidors de Cdk4); p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} i p19^{INK4D}. Aquestes proteïnes contenen múltiples repeticions del tipus ankirina, (motius de 33 aminoàcids responsables de moltes interaccions proteïna-proteïna), però només s'uneixen a Cdk4 i a Cdk6 i no a d'altres subunitats cdk ni a les Ciclines D. La segona família (CIP/KIP) és de més ampli aspectre i afecta a les activitats dels complexos amb Ciclines D, E, A i B. Aquesta família inclou els membres; p21^{Cip1}, p27^{Kip1} i p57^{Kip2}, i tots ells contenen motius característics a la meitat de l'extrem N-ter que els permeten unir-se tant a les subunitats ciclina com a les subunitats cdk.



Esquema 3. Representació dels principals elements de regulació de l'activitat Cdk.

1.7 Inici del cycle cel.lular i dependència de factors externs

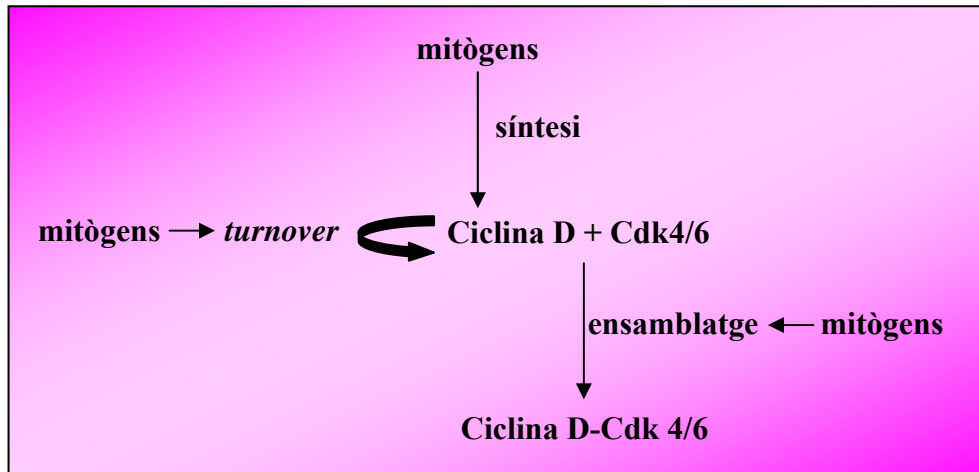
Mentre en els primers estadis embrionaris, on els nivells de la Ciclina E són sempre elevats i els continguts de nutrients parentals també, la replicació del DNA comença just quan finalitza la mitosi. És en les cèl.lules postembrionàries on s'ha generat la fase G1 i una maquinària molecular que fa que la cèl.lula sigui dependent del medi extern.

Els llevats de gemmació i les cèl.lules de mamífer tenen períodes de G1 relativament llargs on els nutrients i els factors de creixement permeten que la cèl.lula progressi cap a la fase S, o per contra, entri en una fase d'arrest latent, anomenada G0. Els defectes en G1 són universals entre tumors, i la importància d'aquesta fase es reflecteix en l'existència de diferents ciclines especialitzades només en la seva regulació.

Quan les cèl.lules quiescents reben estímuls mitogènics la ruta mitogènica de Ras promou la transcripció dels gens de les Ciclines D (D1, D2 i D3) a través d'una ruta seqüencial on participen les activitats consecutives de Raf-1, MEK1, MEK2 i proteïnes

kinasa regulades a través de factors mitogènics externs, proteïnes ERK (59,336). L'ensamblatge de les Ciclines D amb Cdk4/6 també requereix les senyals mitogèniques externes, de manera que la formació del complex depèn d'efectors finals d'aquesta ruta encara desconeguts.

A la vegada, el *turnover* de la Ciclina D depèn d'una ruta paral·lela de Ras, on les kinases PI3K i Akt actuen consecutivament inhibint la kinasa GSK3 β , capaç d'iniciar la degradació de la Ciclina D1 a través de la fosforilació al residu Thr286 (84). Així, es pot dir que les Ciclines D actuen com a sensors de creixement, ja que tant la transcripció, com l'ensamblatge i el recanvi de la proteïna depenen de senyals mitogèniques de l'exterior (**Esquema 4**).



Esquema 4. Dependència dels agents mitogènics externs per l'inici del cicle cel·lular.

1.8 Transició G1-S

La funció més coneguda de la Ciclina D és la fosforilació de la *pocket protein* pRB, o proteïna del retinoblastoma (69). Els complexos cdk-Ciclina D inicien aquesta fosforilació a la meitat de la fase G1, després de la qual esdevenen actius els complexos Cdk2-Ciclina E que completen aquest procés de fosforilació actuant sobre llocs addicionals de pRB. La hiperfosforilació de pRb a finals de la fase G1 actua desfent la seva associació amb diferents membres de la família E2F. Els factors E2F lliures migren al nucli permetent la transcripció d'un banc de gens necessaris per l'inici de la fase S, entre els quals hi ha els gens de la Ciclina E i A necessaris per la transició de G1 fins a S.

En mamífers, les *pocket proteins* (pRB, p107 i p130) i la família de factors de transcripció E2F (E2F 1-7) poden dividir-se en subgrups segons les seves funcions principals (69). Tant pRB com p107 i p130 poden unir diferents membres d'E2F, i ser fosforilats pels complexos ciclina-cdk de G1, comportant la dissociació i activació de les proteïnes E2F com a inductors i/o repressors de l'expressió gènica (**Taula 1**).

Proteïna E2F	Funció	Repressor
E2F1	activadora	pRB
E2F2	activadora	pRB
E2F3a	activadora	pRB
E2F3b	repressora	+/- pRB
E2F4	repressora	p107, p130
E2F5	repressora	p107, p130
E2F6	repressora	altres
E2F7	repressora	altres

Taula 1. Funció dels diferents membres de la família E2F i les seves proteïnes repressores

pRB s'expressa tant en cèl.lules quiescents com en cèl.lules proliferants, mentre que p107 s'expressa predominantment en cèl.lules proliferants i p130 en cèl.lules arrestades. A la vegada, p107 i p130 són més similars entre elles estructural i funcionalment que no pas pRB. En conjunt, aquestes diferències estructurals i del patró d'expressió de les *pocket proteins* faciliten o impedeixen la formació de diferents complexos amb els membres d'E2F, regulant l'expressió d'un grup determinat de gens.

Els estudis de les interaccions entre E2F i les *pocket proteins*, mitjançant immunoprecipitació de cromatina, han establert les interaccions existents en funció dels diferents estadis del cicle cel.lular (69).

Dins la família E2F els membres E2F1, E2F2 i E2F3a són activadors transcripcionals molt potents que s'uneixen preferencialment a pRB (**Taula 1**). E2F3a normalment és absent o s'expressa molt poc, però s'indueix i té activitat transcripcional a finals de la fase G1. La variant E2F3b s'expressa durant tot el cicle cel.lular, i s'ha implicat en la formació de complexos repressors, amb o sense pRB, durant la fase G0.

Per contra E2F4, i menys abundantment E2F5, són repressors transcripcionals poc eficients, en part degut a la seva dèbil presència al nucli. S'expressen durant tot el cicle cel.lular però és a G0 i a començaments de G1 quan s'uneixen a p107 i p130 per ser conduïdes al nucli. Finalment, E2F6 i E2F7 no s'uneixen a les *pocket proteins*, però sí que formen complexos amb altres proteïnes amb activitat repressora de la transcripció.

Així, a G0 i a començaments de G1, p107 i p130 formen complexos repressors amb E2F4 o E2F5 en quasi tots els elements promotors regulables per E2F. El mecanisme de repressió és a través del reclutament de les histona desacetilases tipus I (HDACs) de manera que eliminen grups acetil de les Histones H3 i H4 transformant les regions de cromatina dels promotors en zones refractàries a l'inici de transcripció (69). També a G0 i a començaments de G1 pRB s'uneix a E2F1-3 segrestant-los dels promotors, mentre que E2F6 s'uneix a proteïnes *polycomb* i a d'altres proteïnes repressores.

A finals de G1 les *pocket proteins* són fosforilades i les proteïnes E2F es dissocien (69). En aquest punt E2F4 i E2F5 són traslocades al citoplasma i als llocs vacants dels promotors, i a altres zones més específiques, s'hi uneixen E2F1-3. Per molts promotors la unió amb E2F1-3 es correspon amb un reclutament de les histones acetiltransferases (HAT), incrementant l'acetilació de les histones i l'activitat transcripcional. De totes maneres, l'expressió de gens com *ciclina A2* no es dona de manera immediata i caldrà encara la unió d'altres cofactors.

Després de l'entrada a la fase G1, els E2F1-3 continuen units i activant molts promotors, però també n'uneixen de nous, específics de la transició de G1 a S.

Una funció no catalítica dels complexos amb Ciclina D és la del segrestar els membres de la família CIP/KIP (59,336). La interacció de p21^{Cip1} i p27^{Kip1} amb els complexos amb Ciclina D permet l'activitat del complex Ciclina E-Cdk2 a finals de G1. D'aquesta manera es crea una competició per unir els inhibidors p21^{Cip1} i p27^{Kip1} fins que els nivells dels cdki són prou baixos perquè hi hagi una activació dels complexos amb Ciclina E. A la vegada, els complexos Ciclina E-Cdk2 poden fosforilar p27^{Kip1} a Thr187 per activar la seva degradació. En aquest estadi la progressió del cicle cel.lular encara és dependent de l'exterior, ja que una disminució dels nivells de mitogens pot provocar una disminució de la síntesi de les Ciclines D i l'alliberament de les mol.lècules de p21^{Cip1} i p27^{Kip1} segrestades pels seus complexos. L'increment de p21^{Cip1} i p27^{Kip1} lliures inhibeix els complexos amb Ciclina E i atura el cicle cel.lular en l'anomenat Punt de Restricció de G1. Només la presència de suficients mitògens permetrà el segrest de p21^{Cip1} i p27^{Kip1} i l'activació dels complexos amb Ciclines E i A que continuaran mantenint l'estat hiperfosforilat de pRB. Així, una vegada Cdk2 ja és activa manté pRB hiperfosforilada, generant un *feedback* positiu, i la continuació del cicle cel.lular es fa independent de les senyals mitogèniques externes, resultant en un procés irreversible a partir de l'entrada de la fase S. Més endavant la Ciclina E i la Ciclina A seran fosforilades per ser proteolitzades al final de la fase S i en G2, respectivament, ajustant la maquinària molecular pel pròxim cicle cel.lular.

Les dues funcions dels complexos de la Ciclina D no són contradictòries, ja que el segrest de p21^{Cip1} i p27^{Kip1} no sembla inactivar la funció dels complexos Cdk4/6-Ciclina D en fosforilar pRB, sinó tot al contrari. *In vivo* els tres membres de la família Cip/Kip transloquen els complexos Cdk4-Ciclina D al nucli i estimulen la unió de les dues subunitats comportant l'activitat del complex. A la vegada, els animals deficientes per p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, o els dos alhora, no mostren complexos Ciclina D-cdk i la seva activitat és gairebé indetectable. Malgrat tot, el cicle cel.lular no es veu alterat.

De la mateixa manera, els ratolins sense Ciclina D1, Ciclina D2, o cap de les dues, són viables encara que tenen alguns defectes en desenvolupament. Aquests defectes poden ser completament compensats per la sobreexpressió de la Ciclina E, demostrant que la funció d'aquesta ciclina es situa *downstream* l'activitat de les ciclines D.

La reintroducció de p21^{Cip1} o p27^{Kip1} promou l'activitat del complex sobre pRB a través de dues maneres; dirigint el complex heterodimèric al nucli i incrementant l'estabilitat de la Ciclina D, ja que lliure és poc estable.

Així, les proteïnes INK4, inhibidores dels complexos amb Ciclina D, depenen de l'acció prèvia de Cip/Kip per induir l'arrest de la fase G1, ja que només actuen quan el complex cdk-ciclina està format i és actiu. Les senyals que comporten l'expressió de les proteïnes INK4 encara es desconeixen, però és clar que p15 s'indueix per TGF- β i contribueix a l'arrest de G, p16 s'acumula durant la senescència cel.lular, mentre que p18 i p19 s'expressen només durant el desenvolupament fetal.

Hi ha diferents evidències que mostren la necessitat de l'activació de Cdk2 en eucariotes per tal d'iniciar la síntesi de DNA:

1-A mesura que la cèl.lula s'aproxima a G1-S el control del cicle cel.lular és dominat per la Ciclina E, i posteriorment per la Ciclina A, amb l'objectiu d'activar Cdk2. Aquesta kinasa s'uneix primerament a la Ciclina E just abans del començament de la

fase S, i aquest complex pot fosforilar la proteïna nuclear NPAT essencial per un dels principals events durant la fase S, l'activació dels gens de les histones.

2-L'activitat del complex Cdk2-Ciclina E sembla necessària en la duplicació del centrosoma, ja que és capaç de fosforilar la proteïna Nucleofosmina causant la seva dissociació dels centrosomes i el conseqüent inici de la duplicació centrosòmica.

3-Abans de la fase S la kinasa Cdk2 forma complexos amb la Ciclina E, mentre que a l'inici de la fase S aquests complexos són substituïts pels complexos Ciclina A-Cdk2. La microinjecció d'anticossos contra Cdk2 unida a la Ciclina A o a la Ciclina E bloqueja l'inici de la síntesi de DNA, indicant que tant Cdk2 com ambdues ciclines són necessàries per la fase S. Una vegada la fase S ha començat, la injecció d'anticossos contra la Ciclina A causa una aturada en la fase G2, indicant que la Ciclina A és necessària per l'inici, però no per la progressió de la fase S.

1.9 Transició G2-M

La fase G2 és un període del cicle cel.lular en el qual la cèl.lula assegura la correcta finalització de la replicació del DNA i es prepara per la mitosi i la citocinesi.

Com en totes les Cdk, la fosforilació al *T-loop* (Thr160) de Cdk1 a través de la kinasa CAK és necessària per la seva activació (55). La síntesi de la Ciclina B comença al final de la fase S i durant la fase G2 els complexos Cdk1-Ciclina B es mantenen en un estat inactiu a través de la fosforilació a la Thr14 i a la Thr15. El complex Ciclina B-Cdk1 esdevé totalment actiu després de la desfosforilació d'aquests residus per la fosfatasa Cdc25C durant la mitosi.

La mitosi, o també anomenada cariocinesi, i la citocinesi constitueixen la fase més curta del cicle cel.lular eucariota, comprenent entre 1-2h. La mitosi es compon de cinc fases diferents (veure **Capítol 7, apartat 1.2**):

1-Profase: comença amb la condensació dels cromosomes al nucli i acaba amb el trencament de la membrana nuclear.

2-Prometafase: es forma el fus mitòtic i aquest configura un eix bipolar, les cromàtides germanes dels cromosomes replicats es comencen a separar en pols oposats i els cromosomes s'aliniïen prop de l'equador del fus.

3-Metafase: tots els cromosomes estan biorientats i posicionats prop de l'equador del fus mitòtic, formant el que s'anomena placa metafàsica.

4-Anafase: les cromàtides germanes es separen i formen cromosomes independents.

5-Telofase: al final de la mitosi els cromosomes es descondensen i es comença a formar la membrana nuclear al voltant de cada joc de cromosomes. Un anell contràctil estreny la cèl.lula formant dues cèl.lules filles, cadascuna amb un nucli.

Quan la cèl.lula entra en la mitosi els nivells de la Ciclina A comencen a disminuir, però encara es manté present durant la profase, en la qual s'associa als centrosomes. A la telofase la Ciclina A ja és indetectable. Els complexos Ciclina A-Cdk1 juguen un

paper important en l'activació del complex Ciclina B-Cdk1, i estudis recents mostren com el complex Ciclina A-Cdk1 també pot actuar durant el *checkpoint* de G2.

Durant la interfase i la profase els complexos Cdk1-Ciclina B es troben al citoplasma, i durant la profase s'associen als centrosomes duplicats promovent la seva separació a través de la fosforilació de la proteïna motora associada Eg5.

A finals de la profase la major part d'aquests complexos es troben al nucli, seguit de la desintegració de l'envolta nuclear. Tot i aquesta localització nuclear, la Ciclina B conté una seqüència de retenció citoplasmàtica (CRS) a l'extrem N-ter que evita la migració al nucli (305). A més, dins la CRS de la Ciclina B també hi ha una seqüència d'export nuclear (NES) que s'uneix al receptor d'export nuclear CRM1. La regió CRS de la Ciclina B1 està hiperfosforilada durant la mitosi, i aquesta fosforilació es creu que pot afectar les interaccions amb CRM1 i mantenir la Ciclina B al nucli abans de la desintegració de l'envolta nuclear. El mecanisme pel qual la Ciclina B entra al nucli es coneix menys, ja que ni la Ciclina B ni Cdk1 tenen seqüències de localització nuclear (NLS). Tanmateix, la Ciclina B1 es pot unir a la importina- β , i a través d'aquesta i altres proteïnes podria entrar al nucli.

Els complexos Ciclina B-Cdk1 també estan involucrats en la fragmentació de l'aparell de Golgi, en la fragmentació de l'envolta nuclear i en l'arrodoniment de la cèl.lula. L'envolta nuclear consisteix d'una doble bicapa lipídica contigua amb el reticle endoplasmàtic. La superfície interna de la membrana nuclear interna està limitada per una xarxa proteica anomenada làmina nuclear. La làmina nuclear està formada per la polimerització de tres proteïnes conegudes com làmina A, B i C. Quan la cèl.lula entra en la mitosi les làmines A, B i C són fosforilades i perden la seva interacció entre elles. Aquesta fosforilació es porta a terme pel complex Cdk1-Ciclina B, que pot desensamblar els polímers de la làmina nuclear *in vitro*.

El trencament de l'envoltura nuclear també enfatitza la importància de la localització dels complexos cdk-ciclina. Durant la interfase la Ciclina B és activament exportada del nucli bloquejant el seu accés a les làmines. Quan les cèl.lules entren a la mitosi, la Ciclina B és fosforilada inactivant la seva senyal de retenció citoplasmàtica i s'accelera el seu import, detectant-se un ràpid increment de la seva concentració nuclear quan l'envoltura es comença a trencar. Aquest mecanisme, suggereix el funcionament d'un *feedback* positiu on els complexos Ciclina B-Cdk1 entren dins el nucli i desestructuren els porus nuclears des de l'interior, abolint la barrera entre nucli i citoplasma i comportant un increment exponencial de la concentració del complex dins el nucli abans del seu trencament.

Finalment, la sortida de la mitosi requereix la degradació de la Ciclina A i la Ciclina B, i aquesta es dona a través d'una via dependent de la ubiquitina regulada per APC.

Al final de la mitosi la cèl.lula assegura la seva divisió a través d'un procés anomenat citocinesi. En aquest procés es forma un anell contràctil d'actina i miosina que es constreny a la meitat de la cèl.lula mare, al mateix temps que es forma una nova membrana intermitja i interna a la cèl.lula. Al final de la citocinesi la cèl.lula mare ha donat lloc a dues cèl.lules filles.

1.10 Degradació de les Ciclines

Totes les ciclines conegudes són dirigides al proteasoma per la seva degradació a través de l'addició de cadenes d'ubiquitina, encara que els detalls d'aquestes addicions difereixin de ciclina a ciclina. Les ciclines de G1 són ubiquitinades pels complexos

SCF, mentre que les ciclins mitòtiques ho són per APC (Anafase-Promoting Complex). Aquests dos complexos també són capaços de degradar moltes altres proteïnes, i fins i tot comparteixen certs elements d'organització i possiblement un mateix origen.

Els complexos SCF (Skp1, Cul1 i F-box) representen una gran família de lligases d'ubiquitina actives durant tot el cicle cel·lular que regulen la degradació d'un gran nombre de proteïnes com: ciclins, cdk i cdk1. La destrucció d'aquests substrats depèn de la seva fosforilació prèvia a través de diferents proteïnes del tipus F box.

L'actuació de la lligasa d'ubiquitina APC (Anaphase-Promoting Complex) regula la sortida de la mitosi mitjançant la degradació de les ciclins mitòtiques a través de la seva seqüència *destruction box*.

APC és una lligasa multimèrica que es manté inactiva durant les fases S i G2 del cicle cel·lular. L'activació d'APC en mitosi com a resultat de la fosforilació i degradació del seu inhibidor Emi1, suposadament per l'acció de l'enzim PLK1 i/o el complex Ciclina B-Cdk1, es requereix per la degradació de les ciclins mitòtiques i per la separació de les cromàtides germanes durant l'anafase, causant indirectament la destrucció del complex cohesina responsable de la unió de les cromàtides germanes a partir de la fase S i fins a l'anafase. Així, l'activació d'APC abans d'hora és desastrós per la cèl·lula, ja que implica una distribució incorrecta dels cromosomes. Per evitar aquest repartiment asimètric es coneixen dos mecanismes de control. Per una banda les ciclins mitòtiques dirigeixen la seva pròpia degradació a través de l'activació d'APC i per tant, un retard en l'ensamblatge de la maquinària del cicle cel·lular responsable de l'activació de Cdk1 retarda també l'activació d'APC. A la vegada, hi ha un sistema de control del fus mitòtic, o *spindle checkpoint*, que monitoritza les interaccions entre els cromosomes i els microtúbuls, inhibint l'activació d'APC en cèl·lules que encara no tenen els cromosomes aliniats correctament.

Finalment, la pròpia degradació de la Ciclina B per APC i la inhibició del complex Ciclina B-Cdk1 retornen l'activitat a Emi1 i la conseqüent inhibició d'APC, assegurant l'estabilitat de les noves ciclins i del complex cohesina a partir d'aquest moment i fins a l'anafase del cicle cel·lular següent.

2 Introducció als *checkpoints* del cicle cel·lular

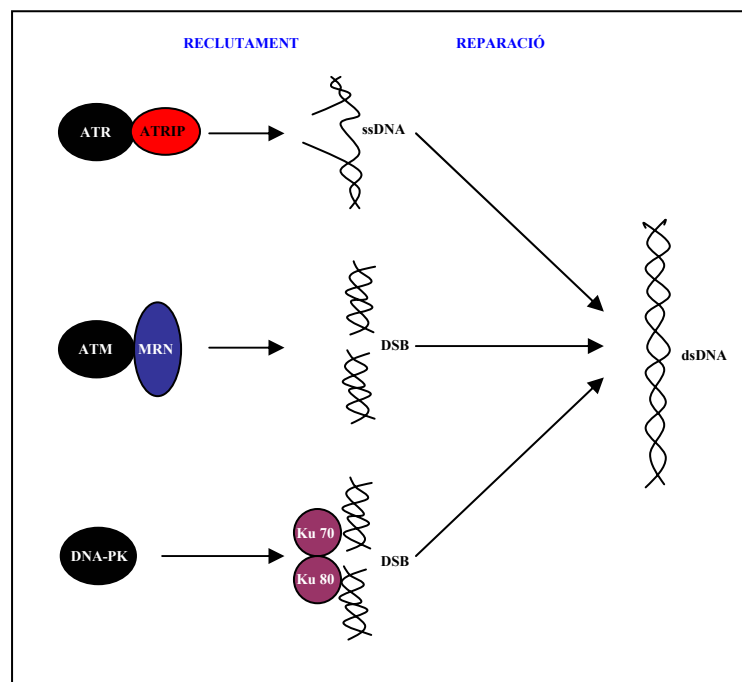
2.1 Reclutament d'ATM, ATR i DNA-PK als punts de dany al DNA

Els trencaments del DNA comporten un seguit de respostes en les cèl·lules eucariotes que inclouen una parada del cicle cel·lular, la relocalització de factors de reparació del DNA i en alguns casos apoptosi dependent de p53. Si la parada del cicle cel·lular no es fa efectiva, la replicació del DNA danyat produirà un alt grau d'inestabilitat genòmica lligada, inevitablement, a un increment en la probabilitat de la transformació oncogènica.

En els processos de resposta al dany al DNA intervenen tres grups de proteïnes conservades que actuen conjuntament per transmetre el senyal del dany al DNA a la maquinària que farà efectiva l'aturada del cicle cel·lular i la reparació del DNA. Aquests tres grups comprenen proteïnes que actuen com a sensors de reconeixement del dany al DNA, proteïnes transmissores PIKK (PI3K related protein kinase) que envien i amplifiquen la senyal, i proteïnes efectores que controlen la progressió del cicle cel·lular, la restructuració de la cromatina i la reparació del DNA (93).

El reclutament de les PIKK (ATR, DNA-PK i ATM,) a les lesions de DNA és un pas fonamental per l'activació de les seves funcions en reparació del DNA danyat i senyalització del *checkpoint* del cicle cel.lular (93). Actualment, el mecanisme de detecció del dany al DNA en mamífers encara no han estat clarament identificades, però hi ha evidències recents on s'indica que els canvis en l'estructura de la cromatina, més que el danys al DNA *per se*, són els causants de la seva activació. En aquest procés, encara que hi ha cert grau d'interacció entre les PIKK i el DNA, aquesta interacció és facilitada per proteïnes intermèdies (**Esquema 5**). El reclutament d'ATR al DNA monocadena (ssDNA) requereix la proteïna ATRIP, mentre que la interacció de la DNA-PK als trencaments de doble cadena (DSB) del DNA és mediada per l'heterodímer Ku70-Ku80. Recentment el complex Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN), altament conservat al llarg de l'evolució i responsable de l'activitat exo i endonucleasa que permet la reparació DSB, també ha estat implicat en el reclutament d'ATM en aquests punts. La regió C-ter de Nbs1 actua reclutant ATM als llocs de dany al DNA promovent la fosforilació de les dianes d'ATM i activant els events de resposta al dany al DNA. A la vegada Nbs1 pot ser fosforilada per ATM al residu Ser343 en resposta al dany al DNA, generant un *feedback* positiu.

La regió C-ter de Nbs1 té homologia amb les regions C-ter d'ATRIP i Ku80, indicant la importància d'aquestes regions a l'hora d'interaccionar amb ATM, ATR i DNA-PK, respectivament (93). Motius anàlegs existeixen al C-ter de tots els ortòlegs de Nbs1, suggerint que aquesta funció s'ha conservat a través de l'evolució eucariota. La disrupció d'aquests motius en Nbs1, ATRIP i Ku80 coincideix amb una reparació ineficient *in vivo* degut a l'ineficient reclutament i activació de les PIKK.

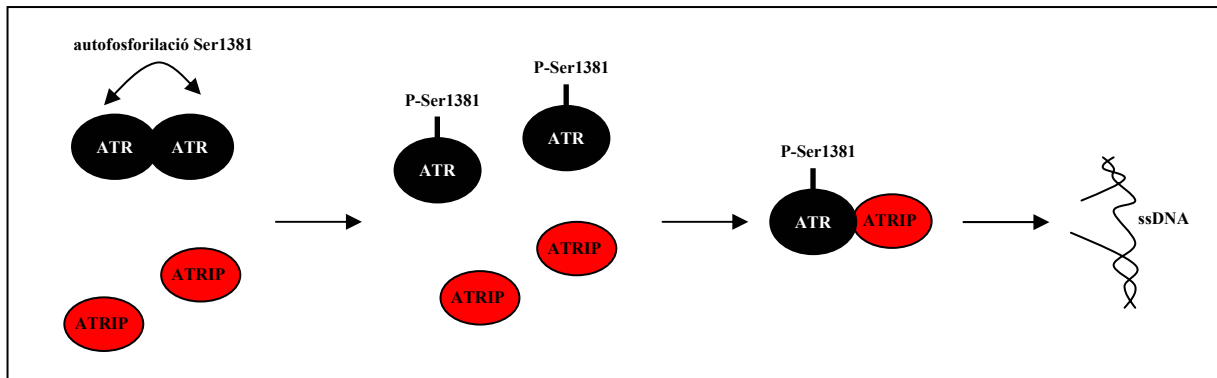


Esquema 5. Reclutament de les PIKK al DNA danyat a través de proteïnes intermèdies.

Encara que els mecanismes de reclutament d'ATM, ATR i DNA-PK són molt similars entre ells, també hi ha certes diferències. L'ensamblatge entre DNA-PK i Ku80 requereix la presència de DNA (**Esquema 5**), suggerint que la proteïna Ku80, o

l'heterodímer Ku70-Ku80, s'uneix primerament al DNA i després es recluta la DNA-PK. Per contra, ATR i ATRIP sembla que formen un complex abans d'arribar a interaccionar amb el DNA, de la mateixa manera que semblen fer-ho ATM i MRN, ja que el trencament del DNA *in vitro* no afecta a la interacció d'aquestes proteïnes, suggerint l'existència d'un complex preformat.

Altres estudis demostren que la funció d'ATM es modulada per dos passos (**Esquema 6**). En el primer pas ATM s'autofosforila al residu Ser1981, fet que facilita la dissociació del dímer inactiu d'ATM en monòmers actius, i en el segon pas hi ha el reclutament d'ATM als llocs danyats de DNA.



Esquema 6. Activació d'ATM a través d'autofosforilació i reclutament al punt de dany al DNA.

La regió C-ter de Nbs1 no sembla necessària per l'autofosforilació d'ATM, però sí que és essencial pel reclutament d'ATM als llocs DSB del DNA facilitant la fosforilació de les dianes d'ATM als mateixos llocs d'actuació. Per tant, l'autofosforilació d'ATM a través dels DSB es podria donar a través d'altres elements del complex MRN diferents del domini C-ter de Nbs1.

2.2 Activació dels *checkpoints* dependents de Chk1 i Chk2

Tot i la participació menys coneguda de la kinasa DNA-PK, les kinases ATM i ATR fosforilen i activen principalment les kinases efectores del checkpoint Chk2 i Chk1, respectivament. La via ATM-Chk2 no és essencial per la viabilitat cel.lular, però és activada principalment a través de la radiació ionitzant (IR), mentre que la ruta ATR-Chk1 s'indueix principalment per replicons de DNA encallats i la radiació UV, i és essencial en l'embriogènesi.

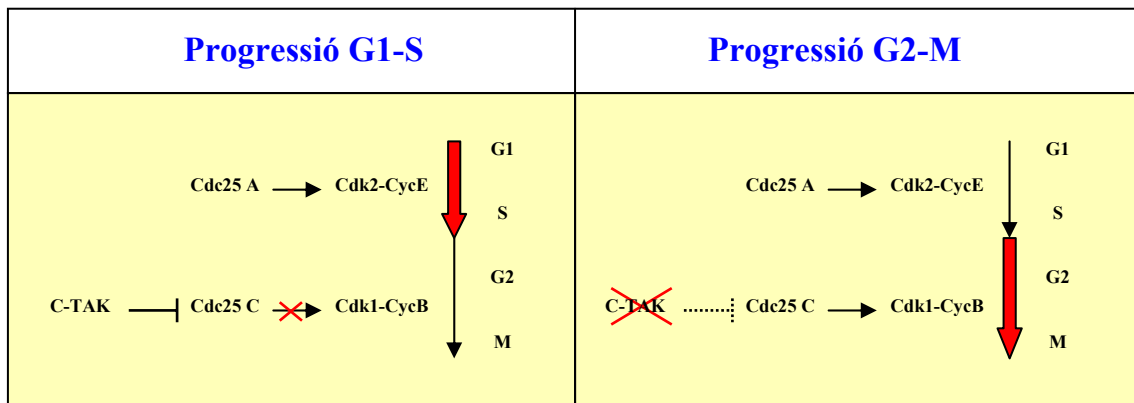
Així doncs, en presència de dany al DNA per radiació UV Chk1 és fosforilada i activada preferencialment per ATR, mentre que Chk2 ho és per ATM en condicions de radiació ionitzant, encara que hi ha cert nivell d'activació creuada. A la vegada, tot i que les kinases Chk1 i Chk2 són estructuralment diferents, fosforilen substrats comuns i poden tenir funcions parcialment solapades. En l'activació dels *checkpoints* del cicle cel.lular les proteïnes Chk1 i Chk2 són responsables de la fosforilació i inhibició dels homòlegs cdc25.

Com s'ha dit anteriorment, les fosfatases cdc25 catalitzen la progressió del cicle cel.lular a través de l'activació de les Cdk. Existeixen tres homòlegs de cdc25 en humans que regulen diferents fases del cicle cel.lular. Cdc25A activa Cdk2-Ciclina E regulant la progressió cap a S, Cdc25C catalitza la progressió cap a la fase M activant

Cdk1-Ciclina B i Cdc25B és menys coneguda i sembla actuar de manera redundant amb la Cdc25C activant el complex Cdk2-Ciclina A a finals de G2.

En condicions normals, on ATM/ATR i Chk1/2 estan inhibides, hi ha una acumulació de Cdc25A durant G1 que causa l'activació del complex Ciclina E-Cdk2 i la progressió de la fase S, mentre que la Cdc25C es manté inactiva a causa de l'acció inhibidora de la kinasa C-Tak1 (**Esquema 7**). Curiosament, els nivells de Cdc25A també incrementen durant la fase G2, però es desconeix el seu paper més enllà de la progressió de la fase S.

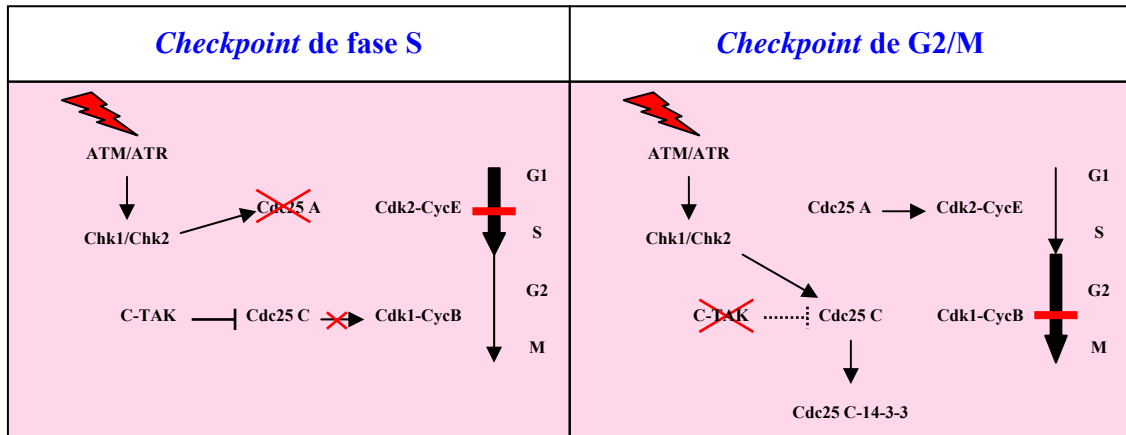
Quan la cèl.lula arriba a la fase G2 la kinasa C-Tak1 és inactivada i Cdc25C permet l'entrada a la fase M a través del complex Cdk1-Ciclina B, si no hi ha hagut dany al DNA. La funció de C-Tak1 no és redundat a la de Chk1/2, sinó que està en un nivell superior de la regulació de Cdc25C, evitant una activació de Cdc25C en la fase equivocada del cycle cel.lular. Així, en condicions normals només és possible una activació de Cdc25C al començament de la fase M degut a la inactivació de C-Tak1 per un mecanisme encara desconegut.



Esquema 7. Regulació de la progressió del cycle cel.lular a través de les fosfatases cdc25.

En resposta al dany al DNA Cdc25A és fosforilada ràpidament per Chk1 i Chk2 a l'extrem N-ter, promovent ràpidament la seva degradació i una aturada del cycle cel.lular en el *checkpoint* de la fase S a causa de la inactivació del complex Cdk2-Cyclina E (**Esquema 8**).

En cas de dany al DNA i activació d'ATM/ATR les kinases Chk1/2 també poden aturar l'activació de Cdc25C i l'entrada a fase M en el *checkpoint* de G2/M. En aquestes condicions Chk1 i Chk2 fosforilen Cdc25C en 2 llocs solapats a l'N-ter creant un lloc d'unió a una proteïna petita d'unió a fosfoferines, 14-3-3σ. La unió de 14-3-3σ pot prevenir la localització nuclear de Cdc25C enmascarant l'NLS proper als residus fosforilats i inhibint al mateix temps la seva activitat aturant la cèl.lula a G2/M degut a la manca del complex actiu Cdk1-Ciclina B (**Esquema 8**).



Esquema 8. Activació dels checkpoints del cicle cel·lular a través del dany al DNA i l'activació de les kinases ATM/ATR.

La fosfatasa Cdc25B també és regulada en resposta al dany al DNA per la radiació UV, però el rol de les kinases chk en aquesta regulació encara no és conegut. Finalment, les aturades en el cicle cel·lular són necessàries per tal de reparar el dany genòmic abans de la seva propagació a les cèl·lules filles en la fase M, evitant així la formació de tumors a partir de cèl·lules alterades genèticament

2.3 Dualitat entre Chk1/Chk2

Així com els estímuls que activen preferencialment ATM o ATR provoquen l'activació de les kinases Chk2 o Chk1, respectivament, aquestes dues kinases no actuen a través de mecanismes totalment idèntics. Recentment s'ha mostrat com Chk1, però no Chk2, pot fosforilar Cdc25A al residu Thr507 inhibint la interacció de Cdc25A amb Cdk2-Ciclina E, Cdk1-Ciclina A i Cdk1-Ciclina B i induïnt el *checkpoint* de fase S (376). A la vegada Chk1, però no Chk2, pot fosforilar totes les altres proteïnes cdc25 per aquesta regulació inhibidora independent de 14-3-3 σ . Per tant, Chk2 i Chk1 semblen regular de manera diferent les fosfatases Cdc25, ja que Chk2 no pot fosforilar Cdc25A ni els altres membres Cdc25 en el seu extrem C-ter.

En conjunt, Chk2 sembla tenir un paper més limitat en l'activació dels *checkpoints*. Aquestes divergències podrien explicar la dualitat que hi ha en les kinases *upstream* i la selectivitat en la transmissió d'alguns estímuls a l'hora de provocar una resposta cel·lular concreta. Un cop el DNA s'ha reparat, la progressió del cicle cel·lular fa que la cèl·lula es pugui dividir i proliferar amb normalitat.

2.4 Activació dels *checkpoints* dependents de p53

ATM i ATR també poden fosforilar p53 al residu Ser15 i induir la fosforilació d'altres residus de manera indirecta a través d'altres kinases com Chk1, Chk2 i PI3K. Aquestes fosforilacions sobre p53 també activen i estableixen la proteïna bloquejant la interacció d'aquesta amb el seu regulador negatiu Mdm2. A la vegada, Mdm2 també pot ser fosforilada per ATM impeding la unió amb p53, fet que incrementa la seva estabilitat. p53 activa pot induir l'aturada del cicle cel·lular en G1 o en G2 a través de l'expressió de l'inhibidor p21^{Cip1} i de la repressió del gen *ciclina B*, respectivament. Així, les cèl·lules tractades amb radiació gamma, radiació UV, cisplatí, o altres agents causants de dany al DNA poden activar un o altre *checkpoint* de cicle cel·lular segons

l'activació específica d'ATM i/o ATR, l'activació preferencial de les kinases Chk1 i/o Chk2 i l'activació de p53. A la vegada, el resultat d'aquestes activacions moltes vegades redundants pot variar segons la fase del cicle cel·lular en que es troba la cèl·lula. Per exemple, les cèl·lules amb p53 funcional s'aturen de manera predominant en G1 a través de l'increment de l'inhibidor p21^{Cip1}, però si les cèl·lules ja han passat per G1 en el moment del dany poden respondre al *checkpoint* de G2 dependent de p53 a través de la inhibició de l'expressió de la Ciclina B.

Les cèl·lules deficientes en p53 mantenen els mecanismes dels *checkpoints* dependents de les kinases Chk1/2 i es poden aturar a les fases S o G2 degut a la inactivació de les fosfatases Cdc25. Per tant, tots aquests factors tenen el seu pes específic a l'hora de definir el *checkpoint* activat per la cèl·lula, i és quan els mecanismes més apicals com el complex MRN i les kinases apicals ATM/ATR deixen de ser operatius que s'observen greus disfuncions en els sistemes de reparació del DNA i en la resposta apoptòtica de p53. Les mutacions al gen *nibrina*, codificant per la proteïna Nbs1 del complex MRN, causen una malaltia anomenada Nijmegen Breakage Syndrome (NBS) on les cèl·lules mostren hipersensibilitat a les radiacions ionitzants i són defectives en els *checkpoints* de S i de G2. El gen *atm* (Ataxia Telangiectasia Mutated) va ser identificat per la presència de mutacions en la síndrome d'Atàxia Telangiectàsia, una malaltia autosòmica recessiva provocada per la manca d'ATM on les cèl·lules presenten una extrema sensibilitat a la radiació gamma caracteritzada per una síntesi de DNA radioresistent. Més crítiques són les mutacions al gen *atr* (Ataxia Telangiectasia Related), ja que la seva inactivació és letal en estadis embrionaris, suggerint la seva importància en el manteniment del genoma en condicions normals.

2.5 E2F1 com a diana d'ATM/ATR

E2F1 també ha estat identificat per ser un substrat de les fosforilacions d'ATM i ATR. En resposta als trencaments de doble cadena (DSB) E2F1 és fosforilada per ATM a la Ser31, un residu no conservat en altres membres de la família E2F (308). La fosforilació en la Ser31 d'E2F1 comporta l'estabilització de la proteïna i crea un lloc d'unió amb la proteïna TopBP1. Aquesta associació després del dany al DNA i la formació de DSBs dirigeix E2F1 cap als amplis dominis nuclears que contenen el DNA trencat, anomenats foci, on es troba amb Brc1 (308). La fosforilació a Ser31 d'E2F1 també afavoreix la seva unió al promotor de p73 i la seva expressió. Igual que p53, p73 pot induir apoptosi i contribuir en alguns casos a l'activitat apoptòtica d'E2F1.

La pèrdua del supressor de tumors pRb comporta una proliferació desregulada que contribueix al desenvolupament de molts càncers a través de la sobreexpressió d'E2F1 i l'expressió dels seus gens diana *ciclina A* i *ciclina E*. En aquests processos també hi ha una acumulació de p53 activa a través de la fosforilació al residu Ser15 que pot ser inhibida amb cafeïna, un potent inhibidor d'ATM i ATR. Per tant, aquestes dues kinases també actuen com a mediadores de l'activació de p53 a través d'E2F1.

Curiosament, l'increment dels nivells totals de p53 és el mateix en cèl·lules normals que en cèl·lules deficientes en ATM després de la sobreexpressió de E2F1, indicant l'existència d'altres mecanismes dependents d'E2F1 que porten a la sobreexpressió de p53 (308). Un d'aquests mecanismes alternatius pot ser l'efecte d'ARF (Alternative Reading Frame), diana d'E2F1 i regulador negatiu de Mdm2. L'increment d'activitat d'E2F1 condueix a l'increment d'ARF i a un increment dels nivells totals de p53, encara que aquests no estan activats per la fosforilació a la Ser15.

2.6 H2AX com a marcador del dany al DNA

ATM és autofosforilada (Ser1981) per tal d'activar-se just després del dany per DSB (297). Com a kinasa activa, ATM fosforila un seguit de proteïnes que intervenen en la reparació del DNA i en els checkpoints, incloent; Nbs1, Chk1, Chk2, p53, E2F1 i també la Histona H2AX, un dels tres tipus d'Histona H2A en eucariotes (174).

Immediatament després de produir-se els trencaments del DNA (entre 1 i 3min), la Histona H2AX és fosforilada per ATM en dos residus situats a la regió C-ter (Ser136 i Ser139). Aquestes fosforilacions incrementen el número de molècules d'histona fosforilada de manera linial segons la gravetat del dany i propicien el reclutament de factors de reparació del DNA com Brca1, 53BP1 i el complex MRN als llocs on hi ha els doble trencaments (297).

La fosforilació de H2AX és bàsicament per l'acció d'ATM just després de detectar-se els trencaments del DNA, indicant que H2AX és un dels primers mediadors *downstream* de la funció d'ATM. A la vegada el reclutament de Nbs1 als foci es fa mitjançant la interacció directa amb H2AX fosforilada, per tant aquesta actua *upstream* de Nbs1 (297). Tanmateix, ATM també pot fosforilar directament Nbs1 (Ser343) generant un *feedback positiu* prou important com perquè certes mutacions en Nbs1 impedeixin l'activació efectiva d'ATM. Els ratolins defectius per Nbs1 i H2AX són viables i comparteixen el fenotip amb els mutants ATM, però el doble mutant és letal (297), suggerint un paper *upstream* d'ATM i una funció *downstream* per H2AX i Nbs1 amb un elevat grau de convergència funcional.

3 Introducció a l'apoptosi

La mort cel.lular programada (PCD), o apoptosi, és un mecanisme fonamental per tots els organismes multicel.lulars. És crucial pel desenvolupament de plantes i animals, per la metamorfosi d'insectes i amfibis, per la morfogènesi dels òrgans, per la homeostasi dels teixits i per l'envelliment i eliminació de les cèl.lules infectades o danyades. Els mecanismes bioquímics de l'apoptosi són altament conservats en l'evolució dels animals multicel.lulars i està controlada per un conjunt de gens, la funcionalitat dels quals manté l'equilibri homeostàtic i evita el desenvolupament de certes malalties. Així, un dèficit en els nivells d'apoptosi pot resultar en malalties com el càncer o l'autoimmunitat, mentre que una mort cel.lular accelerada és comú de malalties degeneratives agudes i cròniques, immunodeficiències i infertilitat.

3.1 Caspases

Els primers estudis genètics de l'apoptosi provenen de *C.elegans*. Aquest nemàtode hermafrodita pateix un programa de mort cel.lular molt característic durant el seu desenvolupament. D'un total de 1090 cèl.lules de l'organisme immadur s'eliminen les mateixes 131 cèl.lules de cada individu, resultant en un organisme madur de 959 cèl.lules. Es veié que per seguir aquest programa de mort cel.lular els gens *ced-3* i *ced-4* són indispensables, mentre que el gen *ced-9* pot evitar la mort cel.lular. Aquests tres gens importants per l'apoptosi de nemàtodes s'han identificat també en mamífers. Així, en mamífers el gen *bcl-2* és l'oncogen homòleg de *ced-9*, i és capaç de mantenir la funcionalitat en *C.elegans*, suggerint que hi ha un elevat grau de conservació en el procés apoptòtic (76). El gen *ced-3* codifica per una proteïna similar a la proteïna ICE (interleukin 1 β converting enzyme) de mamífers, implicada en processos d'imflamació, i l'expressió d'una o l'altra en mamífers indueix la mort cel.lular. ICE ha estat

anomenada també Caspasa-1, i forma part d'una família de proteases dependents d'una Cys al centre actiu de l'enzim. Aquest residu cisteïna permet actuar sobre els residus aspartat de determinats substrats iniciant la proteòlisi. Malgrat aquesta similitud entre les proteïnes Ced-3 i Caspasa-1, la comparació dels seus substrats va evidenciar que l'homòleg de Ced-3 em mamífer és la proteïna CPP32, actualment anomenada Caspasa-3.

Els membres de la família de les caspases es produeixen com a zimògens inactius amb un prodomini N-ter. El tall en dos residus aspartat fa possible la formació d'un heterodímer amb una subunitat gran i una subunitat petita. La formació de tetràmers mitjançant l'agrupació de dos heterodímers donarà lloc a l'enzim funcional amb dos centres actius. En la via apoptòtica hi ha caspases *upstream*, anomenades també caspases iniciadores i amb capacitat autocatalítica per activar-se. Les caspases *downstream* necessiten l'activitat de les caspases *upstream* per tal de ser activades. Alguns membres de les caspases *downstream* (Caspasa-1 i -11) estan implicats en el processament de citoquines proinflamàtories, mentre que d'altres membres *downstream* (Caspasa-3 i -7) executen l'apoptosi processant substrats que comporten canvis morfològics com la degradació del DNA, la condensació de la cromatina, i la pèrdua d'integritat de les membranes.

Els inhibidors de l'apoptosi (IAP) van ser inicialment caracteritzats com a proteïnes codificades per baculovirus amb la funció d'evitar l'apoptosi de les cèl·lules infectades (76). La família dels IAP es caracteritzen per presentar un o més dominis BIR (baculovirus IAP repeat) capaços d'inhibir les caspases-3,-7 i -9 bloquejant l'accés dels substrats. Aquests inhibidors han estat àmpliament estudiats en *Drosophila*, on la regulació de l'apoptosi es dona bàsicament en l'activació de les caspases. En mamífers els IAP estan controlats per diferents mecanismes, incloent la interacció amb SMAC/DIABLO i OMI/HTRA2. Aquestes dues proteïnes resideixen a l'espai intermembranal de la mitocondria i són alliberades durant l'apoptosi interaccionant amb els IAP i promovent l'alliberament de les caspases en forma actives. Tant els IAP com els seus reguladors semblen ser elements indispensables per l'apoptosi de *Drosophila*, però en mamífers l'apoptosi es dona igualment, suggerint una funció prescindible i possiblement de cooperació en l'activació de les caspases.

3.2 Apoptosoma

En la via apoptòtica de *C.elegans* la funcionalitat de *ced-4* s'ha situat *upstream* de la funcionalitat del gen *ced-3*. D'igual manera, *upstream* de la Caspasa-3 (homòleg de *ced-3* en mamífers) s'ha detectat una molècula adaptadora amb homologia per la proteïna Ced-4, anomenada Apaf-1 (apoptotic protease activating factors). En mamífers també s'han identificat dues molècules més amb capacitat per interaccionar amb Apaf-1, actualment conegudes com a Citocrom C i la pròpia Caspasa-9 (76). La Caspasa-9 és una caspasa iniciadora capaç d'autoactivar-se quan s'uneix a Apaf-1, ja que aquesta proteïna adaptadora facilita un increment de la concentració local i un canvi de conformació de la Caspasa-9. Una vegada la Caspasa-9 és activa aquesta és capaç d'activar la Caspasa-3 efectora. Apaf-1 i la Caspasa-9 tenen dominis CARD (caspase recruitment domain) que fan possible la seva interacció en presència del Citocrom C i ATP/dATP. En condicions normals els dominis CARD d'Apaf-1 interaccionen amb els seus dos dominis WD40, però la presència de Citocrom C i la seva interacció amb el

domini WD40 desfà la conformació d'Apaf-1 i fa possible la interacció amb la Caspasa-9 a través del domini CARD que ha quedat lliure.

La unió amb ATP/dATP a Apaf-1 es creu que facilita la formació d'heptàmers d'Apaf-1, adoptant una configuració en forma de roda, anomenada Apoptosoma.

En *C.elegans* la maquinària apoptòtica s'activa quan un membre proapoptòtic de la família de Ced-9 s'uneix a la mitocòndria i desplaça a Ced-4, que migrarà cap a la regió perinuclear. Ced-4 lliure es creu que pot unir Ced-3 i facilitar l'autoactivació d'aquesta caspasa. Malgrat la similitud d'aquests elements apoptòtics entre mamífers i *C.elegans*, també hi ha certes diferències, ja que Ced-4 no s'uneix al Citocrom C i Apaf-1 no es localitza a la mitocòndria, suggerint mecanismes lleugerament diferents en els mamífers.

Encara que l'apoptosoma sigui essencial en moltes de les vies de la mort cel.lular programada en mamífers, les cèl.lules deficientes per aquestes molècules encara moren i els animals deficientes pel Citocrom C, apaf1 o Caspasa-9 mantenen una morfogènesi normal, encara que retardada.

3.3 La família Bcl-2

El primer membre d'aquesta família va ser el proto-oncogen Bcl-2. A diferència d'altres oncogens la sobreexpressió de Bcl-2 no promou la proliferació cel.lular, però bloqueja la mort cel.lular després de la seva inducció per múltiples estímuls bloquejant el trencament de la membrana plasmàtica, la pèrdua de volum cel.lular, la condensació nuclear i el trencament del DNA (76).

En mamífers la família Bcl-2 inclou membres antiapoptòtics i membres proapoptòtics. El primer membre proapoptòtic identificat gràcies a la seva interacció amb Bcl-2 va ser Bax. L'estequiometria de molècules anti i proapoptòtiques com Bcl-2/Bax manté el nivell de sensibilitat de la cèl.lula a patir apoptosi a través de mecanismes intrínsecs que involucren orgànuls com la mitocòndria. Els membres de la família de Bcl-2 es poden dividir en tres subclasses segons la seva homologia en quatre regions denominades *Bcl-2 homology* (BH). Els membres antiapoptòtics tenen homologia a quatre dominis BH1-4 i inclouen Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, A1 i Bcl-W. Els membres proapoptòtics Bax i Bak contenen els dominis BH1-3 i necessiten ser activades per tal d'exposar la cara hidrofòbica de la regió BH3 i interaccionar amb Bcl-2 o Bcl-X_L. Per contra, altres membres proapoptòtics, com BID, només tenen homologia amb el domini BH3 i són anomenats membres *BH3-only*.

La deficiència dels membres Bax i Bak alhora converteix les cèl.lules en resistents als estímuls apoptòtics intrínsecs o independents de receptors de membrana, per tant, aquests dos membres són indispensables per la progressió de l'apoptosi a través dels mecanismes intrínsecs afectant a la mitocòndria i al reticle endoplasmàtic. En cèl.lules viables Bax i Bak existeixen en forma de monòmers. Bax és una proteïna citosòlica o feblement adherida a membranes, però després d'un estímul apoptòtic es localitza a la membrana mitocondrial externa formant multímers. La proteïna Bak inactiva es localitza a la mitocòndria i també pateix un canvi conformacional després de rebre un estímul apoptòtic. Aquest canvi inclou l'oligomerització i la permeabilització de la membrana mitocondrial externa comportant l'alliberament del contingut de l'espai intermembrana, on resideix el Citocrom C. El mecanisme d'alliberament del contingut del material intermembrana encara està en discussió, però hi ha alguns estudis on es

mostra com Bax i Bak poden formar un porus capaç d'alliberar el Citocrom C, i aquest és alliberat abans de la ruptura mitocondrial (76). Finalment les modificacions mitocondrials afecten també a la integritat de la membrana externa ocasionant la pèrdua progressiva del potencial de membrana mitocondrial durant l'apoptosi. La pèrdua del potencial de membrana mitocondrial i del Citocrom C seran un impediment a l'hora de mantenir el metabolisme energètic que requereix la cèl.lula, ocasionant també una pèrdua de la capacitat reductora i l'acumul d'agents tòxics com les espècies reactives de l'oxigen (ROS).

Els membres amb un sol domini BH3 actuen *upstream* en la via apoptòtica. Per exemple, quan els receptors cel.lulars activen la via extrínseca d'apoptosi s'activa la Caspasa-8 i aquesta serà l'encarregada de trencar p22 BID donant lloc al fragment p15 tBID i connectant amb els mecanismes de la via intrínseca, ja que p15 tBID actua a través del seu domini BH3 afavorint l'oligomerització de Bax o Bak per tal d'alliberar el Citocrom C (76).

L'activació dels membres *BH3-only* (Noxa, Puma, Bad, Bim) sembla regulada pel control transcripcional (Noxa i Puma estan regulades per p53) i/o postraduccional (Bad s'inactiva per fosforilació en resposta als factors de creixement). L'activació d'aquestes molècules resulta, directa o indirectament, en l'activació de Bax i Bak i requereix d'aquests membres per l'apoptosi. Per contra, els membres antiapoptòtics com Bcl-2, Bcl-X_L i Mcl-1 actuen segrestant els membres *BH3-only* evitant l'activació de Bax i Bak. Un exemple és Mcl-1, una proteïna citosòlica que cal ser degradada per l'alliberació del Citocrom C després d'un estímul apoptòtic. La degradació de Mcl-1 és necessària abans de la translocació mitocondrial de Bcl-X_L i Bax, així, la integritat de Mcl-1 contrarresta l'acció de Bim protegint Bax i Bak i promovent la supervivència cel.lular.

3.4 Fagocitosi cel.lular

L'apoptosi i la fagocitosi cel.lular formen part d'un continu que caracteritzen aquest procés com a un tipus de mort cel.lular no inflamatòria.

En nemàtodes, el procés d'apoptosi i fagocitosi està regulat i executat per set gens amb homòlegs en eucariotes més evolucionats. Aquests gens es poden dividir en dos grups parcialment redundants i els defectes més greus en el procés de fagocitosi s'observen en els mutants dobles, deficitaris per un gen de cada grup. *Ced-1*, *ced-6* i *ced-7* pertanyen a un sol grup de gens que ajuden al reconeixement de les cèl.lules apoptòtiques, mentre que *ced-2*, *ced-5*, *ced-10* i *ced-12* formen el segon grup de gens amb capacitat per alterar la remodelació del citoesquelet.

Els fagòcits reconeixen la superfície de les cèl.lules apoptòtiques, i en el cas dels mamífers l'exposició de la fosfatidilserina de la membrana plasmàtica a la cara externa és utilitzada com a senyal per iniciar la fagocitosi, tot i que també s'han descrit altres receptors com CD91, CD14, CD36 i la integrina $\alpha\beta3$ com responsables d'aquest reconeixement (76). En *C.elegans* el gen *ced-1* codifica per un receptor que s'agrupa a la membrana de la cèl.lula apoptòtica en coordinació amb *ced-7*. El transportador ABC-1, l'ortòleg de *ced-7* en mamífers, es creu que és capaç de regular la distribució de fosfatidilserina a la membrana.

Els estudis en mamífers indiquen que la disposició dels cossos apoptòtics resultants de la fragmentació de la cèl.lula apoptòtica és important per una funció eficient dels

fagòcits (76). Aquests, a més de ser importants per la fagocitosi de les cèl·lules apoptòtiques també són importants per regular la resposta proinflamatòria, alliberant citokines com TNF- α . Mentre els factors proinflamatoris són importants en la reacció immunitària contra la infecció, la seva absència en l'eliminació de les cèl·lules apoptòtiques és essencial. Això s'aconsegueix, almenys en part, mitjançant l'alliberament de factors anti-inflamatoris incloent TGF- β i IL-10 per macròfags implicats en la fagocitosi dels cossos apoptòtics. Els defectes en l'eliminació d'aquests cossos apoptòtics podrien ser responsables de la formació d'un entorn proinflamatori que pot predisposar als desordres autoimmunitaris.

3.5 Degradació del DNA

La condensació i la fragmentació del nucli són fenòmens morfològics característics de l'apoptosi. La degradació del DNA és un fenomen *downstream* a l'activació de les caspases i es dona primer de tot a les regions riques en A/T, produint fragments de 50-200Kb. L'enzim responsable d'aquests talls és una DNasa activada per caspases (CAD) que en condicions normals es manté inactiva interaccionant amb l'inhibidor ICAD, però aquest pot ser degradat per les caspases 3 i 7 durant l'apoptosi (76). Els lisosomes dels fagòcits també tenen un paper important en la degradació del DNA de la cèl·lula fagocitada a través d'una altra enzima, la DNasa II. Els ratolins deficientes en CAD i DNasaII presenten un increment en la quantitat de DNA no digerit capaç d'activar la immunitat innata i provocar una aturada en el desenvolupament de les cèl·lules T.

En cèl·lules de mamífer la degradació del DNA també pot ser independent de caspases a través de dues proteïnes mitocondrials que es transloquen al nucli després de ser alliberades de la mitocondria: la endonucleasa G i el factor inductor de l'apoptosi (AIF) (76). AIF es troba normalment en l'espai intermembrana del mitocondri i és alliberat en resposta a la mort induïda. La microinjecció d'AIF recombinant a les cèl·lules, o l'addició d'AIF als nuclis aïllats comporta la generació de fenotips apoptòtics com la condensació de la cromatina i l'exposició de la fosfatidilserina a la superfície cel·lular.

En canvi, l'eliminació del gen *aif* en ratolins per recombinació homòloga demostra el seu requeriment per la primera onada d'apoptosi necessària per la morfogènesi embrionària i la cavitació. Aquest fenomen és el primer event de mort celular programada durant la morfogènesi de ratolí, on s'elimina un conjunt de cèl·lules centrals per la formació de la cavitat proamniòtica en l'inici de la gastrulació. La cavitació defectiva en absència d'*aif* podria explicar la letalitat embrionària d'aquests ratolins deficientes, incapaçs d'arribar a la formació del teixit adult. A la vegada la inactivació d'*aif* comporta la formació de cèl·lules mare embrionàries resistents a la mort cel·lular induïda per la deprivació de sèrum, evidenciant la seva implicació en l'apoptosi.

El mecanisme de degradació del DNA a través d'AIF i la endonucleasa G encara es desconeix, tot i que estudis genètics en *C.elegans* suggereixen que poden actuar conjuntament (76). Malgrat tot, en nemàtodes aquestes dues proteïnes actuen de manera dependent de caspases.

3.6 Via extrínseca de transducció de senyals en apoptosi

Els lligands naturals o els anticossos monoclonals que reconeixen els receptors de mort cel·lular situats a la superfície de la cèl·lula; com Fas (Apo-1/CD95) i altres

receptors de la família TNF α , indueixen la mort de la cèl.lular. Aquests receptors contenen un conjunt variat de dominis, incloent els *death domains* (DD) i els *death effector domains* (DED), capaços de formar interaccions homotípiques. Els estudis estructurals d'aquests dominis han demostrat que són molt similars als dominis CARD (caspase recruitment domain), suggerint una evolució conjunta i possiblement comuna dels diferents elements de les vies apoptòtiques (76). En aquesta evolució també han aparegut falsos receptors, o receptors *decoy*, capaços de segrestar els lligands sense propagar la senyal letal degut a la manca, o a la no funcionalitat, dels dominis de mort intracel.lulars.

Com altres receptors de mort Fas és un trímer que canvia de conformació després de la unió del seu lligand, FasL, permetent la formació d'una estructura citoplasmàtica de senyalització, anomenada DISC (Death-Inducing Signal Complex). Una molècula adaptadora FADD/MORT, que conté motius DD i DED, s'uneix als DD de Fas i recluta la pro-Caspasa-8 a través del seu domini DED. L'activació de la Caspasa-8 al complex DISC es creu que es dona per un fenomen d'aproximació, ja que incrementa la concentració local de la pro-Caspasa-8 afavorint la seva activació auto-proteolítica i la subseqüent activació de la Caspasa-3 i la Caspasa-7.

L'apoptosi induïda per Fas pot seguir dues vies. En el cultiu *in vitro* de timòcits la inducció de la mort per Fas no es veu alterada per la presència de Bcl-2, i l'activació de la Caspasa-8 i les caspases efectores és inevitable. Per contra, en els hepatòcits Bcl-2 és capaç de bloquejar la mort induïda per Fas, ja que en aquest cas l'activació de les caspases efectores per la Caspasa 8 es dona a través dels fenòmens mitocondrials inhibibles per Bcl-2.

Un altre conjunt de receptors de mort diferents de Fas i TNF són els DR 4/5, coneguts per unir el lligand TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand). La formació del complex DISC i l'activació de Bid a través d'aquests receptors és similar a la via de Fas en els hepatòcits.

4 Cicle cel.lular i apoptosi

4.1 Cdk2 i apoptosi

Diferents estudis han demostrat que les proteïnes reguladores del cicle cel.lular també poden intervenir en la regulació de l'apoptosi. Alguns d'aquests treballs han implicat la proteïna Cdk2 utilitzant com a model sistemes cel.lulars en proliferació (215). En altres estudis també s'ha demostrat la participació de Cdk2 com a element essencial en l'inici dels processos proapoptòtics en sistemes cel.lulars no proliferants, on l'apoptosi s'ha induït pel tractament amb radiació gamma, dexametasona o el xoc tèrmic (119,132). Tanmateix el mecanisme d'actuació d'aquesta kinasa en els processos de mort cel.lular encara no està clar.

La proliferació cel.lular dificulta la discriminació de l'activitat de Cdk2 en els processos de regulació del cicle cel.lular respecte dels processos apoptòtics. En aquest aspecte els timòcits representen un sistema cel.lular ideal per a l'estudi de l'activitat apoptòtica de Cdk2, ja que són una població cel.lular que en estat natural està sincronitzada a la fase G0 (el 90 % d'aquestes cèl.lules en un timus estan en estat de quiescència), indicant que la funció de Cdk2 en el cicle cel.lular és pràcticament inexistent. Els timòcits aïllats poden ser cultivats *in vitro* i exposats a agents inductors de l'apoptosi com radiació gamma o el glucocorticoide dexametasona. En presència

d'aquests agents inductors l'activitat kinasa de Cdk2 augmenta significativament, correlacionant-se amb l'increment en el número de timòcits que pateixen mort cel.lular, mentre que en les condicions control, mantenint les cèl.lules només en medi de cultiu, l'activitat Cdk2 és molt baixa.

4.2 p27^{Kip1} i apoptosi

Una de les carecterístiques dels timòcits és l'elevat nivell de l'inhibidor p27^{Kip1}. La inducció d'apoptosi a través de l'activació de Cdk2 en aquestes cèl.lules es veu acompanyada per una degradació de p27^{Kip1} (119). En aquestes condicions la degradació de p27^{Kip1} és quasi inexistent en els timòcits de ratolins transgènics per Bcl-2, mentre que en els provinents de ratolins transgènics per Bax la degradació de p27^{Kip1} és més ràpida i eficient, permetent l'increment de l'activitat apoptòtica de Cdk2. Així, és pot dir que p27^{Kip1}, a més de ser un regulador del cicle cel.lular, actua frenant l'apoptosi de timòcits, potser regulant l'activitat apoptòtica de Cdk2.

Experiments amb ratolins deficients per p27^{Kip1} demostren que l'absència d'aquest inhibidor no suposa un canvi en la cinètica d'activació de Cdk2 ni en l'aparició de fenomes apoptòtics espontanis (182). Tanmateix, quan la apoptosi ha estat induïda per radiació gamma o dexametasona la inducció de l'activitat de Cdk2 en absència de p27^{Kip1} és major que en els animals salvatges. Aquests resultats indiquen que l'absència de p27^{Kip1} *per se* no és suficient per induir l'activitat apoptòtica de Cdk2, per tant, calen altres factors inductors d'aquesta kinasa.

4.3 p53 i Cdk2

En timòcits irradiats hi ha una correlació positiva entre l'activació de p53, l'activació de Cdk2 i l'apoptosi (119). Experiments duts a terme amb ratolins deficients per p53 demostren que en aquestes condicions la radiació gamma indueix la mort d'aquestes cèl.lules, la degradació de p27^{Kip1} i l'increment de l'activitat Cdk2 amb una cinètica molt més lenta. En canvi, la manca de p53 no altera l'apoptosi induïda amb el tractament amb dexametasona.

Aquests resultats suggereixen l'existència de dues vies d'inducció d'apoptosi en timòcits on es detecta l'activació de Cdk2. Una de les vies és dependent de p53 i induïble per dany al DNA, mentre l'altra via és independent de p53 i induïble amb el tractament amb glucocorticoides. El receptor de glucocorticoides és àmpliament expressat en el sistema immunitari i media diferents respostes i funcions importants, algunes d'elles contradictòries (apoptosi, proliferació, expressió de citoquines o els seus receptors, expressió de proteïnes de fase aguda o de mediadors de la inflamació, la resposta dels anticossos i diferenciació de cèl.lules T).

4.4 Bax i Bcl-2

La roscovitina és un anàleg sintètic de l'ATP que pot actuar inhibint reversible i selectivament l'activitat de Cdk2, Cdk1 i Cdk5 (240).

El tractament dels timòcits amb roscovitina inhibeix l'activitat de Cdk2 en apoptosi, i al mateix temps, la mort cel.lular induïda tant per la radiació gamma com pel glucocorticoide dexametasona (119). Aquest fet demostra que l'activitat de Cdk2 és necessària en la mort per apoptosi d'aquest tipus cel.lular a través d'aquests dos mecanismes independents.

Experiments del mateix tipus amb ratolins transgènics per Bcl2 mostren increments molt moderats en el número de cèl.lules que pateixen mort cel.lular i en l'activitat de Cdk2, mentre que experiments duts a terme amb ratolins transgènics per Bax mostren una elevada mort cel.lular i un ràpid increment de l'activitat de Cdk2 (119). En ambdós casos, els efectes poden ser totalment inhibits amb roscovitina, demostrant que tant Bax com Bcl-2 poden actuar en la mort cel.lular dependent i independent de p53 regulant de manera *upstream* l'activitat de Cdk2. L'activitat de Cdk1, en canvi, decau a mesura que incrementa l'apoptosi en timòcits, i tot i que Cdk5 està present en timus i molts altres teixits, la seva activitat està restringida només a neurones. Per tant, el fet que la roscovitina pugui inhibir l'activitat d'altres proteïnes Cdk, com Cdk1 i Cdk5, no sembla comprometre el paper de Cdk2 en l'apoptosi timòcits.

4.5 Posicionament de Cdk2 en l'apoptosi de timòcits

Els processos bioquímics que regulen la selecció negativa ha estat origen de moltes investigacions, evidenciant tant en estudis on s'usen cultius primaris de timòcits, com en estudis amb el timus sencer (foetal thymus organ culture, FTOC), que l'activació de Cdk2 és un pas necessari per l'apoptosi d'aquest tipus cèl.lular (407).

Per tal d'establir el posicionament de Cdk2 en els processos apoptòtics de la selecció negativa s'ha induït l'apoptosi del cultiu primari de timòcits amb el glucocorticoide dexametasona o amb etopòsid, un inhibidor de la topoisomerasa II que causa dany al DNA de manera acumulativa (126). Usant l'inhibidor sintètic i reversible de Cdk2, roscovitina, s'ha demostrat que l'activitat Cdk2 és el primer dels events observables en l'apoptosi induïda d'un cultiu primari de timòcits. En aquestes condicions l'activitat Cdk2 és un event *upstream* a l'exposició de la fosfatidilserina de la capa lipídica externa, de l'activació de la Caspasa 8, de la proteòlisi de Bid, de la translocació de Bax a la mitocondria, de la pèrdua de potencial mitocondrial, de la formació de ROS, de l'alliberació de Citocrom C de la mitocondria, de l'activació de les caspases-9 i -3, i de la degradació del DNA. En aquests experiments també s'ha demostrat que l'activació de la Caspasa 8 és un event *downstream* de l'activació de Cdk2, però *upstream* dels fenòmens mitocondrials.

Aquestes dades posicionen l'activació de Cdk2 com l'event apoptòtic més inicial descrit fins l'actualitat. En aquestes condicions els inhibidors de la transcripció i la traducció, actinomicina D i cicloheximida (CHX), respectivament, són capaços d'impedir l'activació de la kinasa Cdk2, bloquejant tots els events *downstream* descrits.

II. Objectius

Conjuntament a la degradació de p27^{Kip1} altres mecanismes, com un increment en l'activitat kinasa específica i/o un increment en els nivells proteics, podrien explicar l'activació de Cdk2 observada en l'apoptosi de timòcits.

Els nivells de Cdk2 són constants en el procés apoptòtic d'aquestes cèl.lules i la presència de dues úniques bandes de Cdk2, corresponent a les dues formes de *splicing* del gen *cdk2* de ratolí, fan pensar que no hi ha canvis traduccionals. Tanmateix, s'observa una devallada en els nivells de la fosforilació de la Tyr15 de Cdk2, indicant l'activació d'aquesta kinasa per mecanismes postraduccionals comuns als observats en les cèl.lules en proliferació. Les alteracions en l'activitat específica de Cdk2 també són possibles per un canvi en l'equilibri de les ciclines que habitualment formen els complexos de Cdk2 actius, o bé, per altres proteïnes capaces de formar complexos amb Cdk2 i conduir l'activitat kinasa cap als substrats d'una ruta apoptòtica.

Per estudiar aquestes possibilitats s'ha mesurat l'activitat de Cdk2 en l'apoptosi de timòcits corresponent als complexos amb Ciclina A i E, les ciclines que habitualment formen els complexos actius de Cdk2 durant el cicle cel.lular. En aquests experiments tan els nivells de Ciclina A com de Ciclina E són baixos i la seva activitat kinasa associada a Cdk2 no augmenta, tot i observar-se un increment de l'activitat total de Cdk2, suggerint que aquesta pot ser activada per altres proteïnes diferents de Ciclina A i E (119). Experiments *in vitro* han demostrat que la Ciclina D2 podria formar complexos actius amb Cdk2, però tant la Ciclina D2 com la Ciclina D3 deixen d'expressar-se en timòcits cultivats *in vitro*, possiblement per la manca de factors de creixement (119). Un tercer membre de la família de les ciclines D, la Ciclina D1, no s'expressa en timòcits en apoptosi (171).

Al mateix temps, experiments duts a terme amb l'inhibidor de la traducció proteica, CHX, demostren que la síntesi *de novo* de proteïnes és indispensable per l'activació de Cdk2 en l'apoptosi de timòcits, ja que en aquest cas els tractaments amb radiació gamma o dexametasona són insuficients per induir l'apoptosi (119,126).

Descartant les Ciclines A, E i D com a possibles activadors apoptòtics de Cdk2, resta demostrar l'existència de complexos de Cdk2 apoptòticament actius amb altres proteïnes com a possibles subunitats activadores de Cdk2. Seguint aquesta seqüència d'esdeveniments, els objectius d'aquesta tesi són els següents:

- 1-Identificació i clonatge de noves ciclines candidates a ser l'activador apoptòtic de Cdk2**
- 2-Estudi bioquímic de l'activador apoptòtic de Cdk2**
- 3-Estudi dels efectes cel.lulars de l'activador apoptòtic de Cdk2 en condicions de sobreexpressió**
- 4-Estudi dels mecanismes de regulació de l'activador apoptòtic de Cdk2**
- 5-Estudi del patró d'expressió i la funcionalitat de l'activador apoptòtic de Cdk2 *in vivo***

III. Materials i Mètodes Generals

1 Tècniques de Biologia Molecular

Les tècniques generals de biologia molecular com l'aïllament de DNA, les digestions amb enzims de restricció, l'amplificació per PCR, les electroforesi de DNA, RNA i proteïnes i altres tècniques bàsiques que no es comenten en aquest treball han estat realitzades com es descriu al llibre Molecular Cloning (323).

2 Clonatge de la Ciclina O i la Ciclina I

Inicialment, el cDNA de la Ciclina O de ratolí va ser amplificat mitjançant múltiples rondes de PCR i utilitzant els oligonucleòtids complementaris a les regions 5' i 3' codificants, MBm5F (5'-GGAATTCCATGGTTACCCCTTGCCCTGCCAGCCC-3') i MBm5R (5'-CGGGATCCTTATTGCCAACTCTGGGGCAGGCTGCACC-3'), respectivament. El material de partida escollit fou una llibreria de cDNA provinent de timòcits apoptòtics tractats amb radiació gamma (5Gy). El cDNA obtingut va ser clonat dins el vector pBluescript (I) SK(+). La zona de clonatge en pBluescript (I) SK(+) conté un elevat nombre de dianes per enzims de restricció, fet que afavorí els subclonatges cap a d'altres vectors d'usos més específics. D'igual manera, la Ciclina I de ratolí va ser amplificada per PCR a partir de la mateixa llibreria de cDNA utilitzant els oligonucleòtids MBIF (5'-CGGGATCCCCATGAAGTTTCCAGGACC-3') i MBIR (5'-CGGAATTCCTACATGACAGAAACAGGC-3') coincidents amb els extrems 5' i 3' de la seqüència codificant descrita. Posteriorment també fou clonada en pBluescript (I) SK(+). Les altres seqüències com el cDNA de les Ciclines A2, D2, D3 i GFP foren obtingudes a partir de diferents vectors disponibles al laboratori. La Ciclina G de ratolí clonada en pBluescript (I) SK(+) va ser donada pel Dr David Beach.

3 Seqüenciació

Els clonatges i les construccions a partir de nous productes de PCR s'han seqüenciat automàticament utilitzant el kit comercial *BigDye Terminator v3.1* basat en el mètode de Sanger. Aquest mètode consisteix en una reacció de PCR que utilitza un sol oligonucleòtid i la incorporació de molècules de 2',3'-dideoxinucleòtid trifosfat (ddNTPs) marcades fluorescentment i incapaces de formar enllaços fosfodiéster amb el deoxinucleòtid següent. Resolent els diferents fragments amplificats per PCR en una electroforesi capil·lar es pot detectar la incorporació de cada ddNTP homòleg a la seqüència motlle segons la seva fluorescència, completant així la seqüència original. Per la PCR de seqüenciació s'han utilitzat 100ng de DNA motlle i s'ha seguit el protocol especificat en el kit comercial.

4 Transfeccions transitòries

24h abans de cada transfecció es van sembrar 1×10^6 cèl·lules HEK293 (Human Embryonic Kidney cells) en una placa de 100mm amb 5ml de D-MEM amb un 10% de FCS i es van incubar a 37°C i 5% de CO₂. Per les transfeccions es van usar 15µg totals de DNA, prèviament precipitat amb 1/10 v:v d'acetat sòdic 3M pH 5.2 i 2,5 v:v d'etanol al 100%. El DNA precipitat es va resuspendre en 450µl d'aigua estèril i 50µl de CaCl₂ 2.5M. Aquesta mescla s'afegí gota a gota dins un tub que contenia 500µl del tampó BBS 2X agitant constantment amb una pipeta Pasteur i creant bombolles d'aire per tal de facilitar la formació homogènia dels complexos de DNA amb fosfat de calci. A les

0h aquests complexos van ser distribuïts gota a gota sobre la placa de cèl·lules pràviament sembrades i es mantingué aquest cultiu transfectat a 37°C i 5% de CO₂ el temps necessari per fer-ne l'anàlisi posterior. Al temps indicat les cèl·lules van ser tripsinitzades i rentades en PBS per tal de comptar les viables mitjançant l'exclusió del colorant trypan blue, fer-ne l'anàlisi per citometria de flux o congelar el *pellet* cel·lular a -80°C.

5 Comptatge de cèl·lules adherides i flotants

72h després de les transfeccions amb pcDNA o amb pcDNA-HA-Ciclina O es va recollir el medi que contenia les cèl·lules HEK293 flotants. Les cèl·lules HEK293 adherides a la placa de 100mm van ser tripsinitzades i recollides posteriorment. Ambdues recol·leccions es van rentar en PBS i es van resuspendre en un volum de 500µl de PBS. Sobre aquest volum s'afegí 100µl d'una solució homogènia i altament concentrada de microesferes de poliestirè. Al mateix temps que les cèl·lules van ser comptades i analitzades per citometria de flux també es quantificà el número de microesferes (identificades pel seu tamany petit i uniforme de 10µm de diàmetre) fins arribar a un mínim de 1000 per mostra. Seguint aquest protocol, el comptatge del mateix número de microesferes de les diferents preparacions cel·lulars, flotants o adherides, és equivalent a l'anàlisi del mateix volum de cada mostra per citometria. Amb aquest procediment es va comparar el número de cèl·lules de cada mostra al mateix temps que se'n feia l'anàlisi del cicle cel·lular i del grau d'apoptosi per citometria (veure **III. Materials i Mètodes Generals, 11 Citometria de flux**).

6 Microscopia òptica confocal i de fluorescència

Es van sembrar 1×10^6 cèl·lules HEK293 en plaques de 100mm en 5ml de D-MEM amb un 10% de FCS que contenien cubreobjectes de vidre prèviament esterilitzats i tractats amb poli-lisina per millorar l'adherència d'aquest tipus cel·lular al vidre. 24h després del cultiu a 37°C i 5% de CO₂ les cèl·lules es van transfectar amb el vector control pEGFP i amb pEGFP-Ciclina O. A diferents temps es van retirar els cubreobjectes amb les cèl·lules transfectades i adherides, i després de 3 rentats amb PBS es van tractar amb PFA al 4% durant 10min per fixar les cèl·lules. Passat aquest temps el PFA 4% fou eliminat amb 3 rentats en PBS i es van teyir els nuclis cel·lulars dipositant una gota de PBS amb 300µg/ml de RNasa i 7,5µg/µl de iodur de propidi sobre els cubreobjectes durant 1min. S'aturà la tinció fent 3 rentats finals amb PBS per eliminar l'excés de iodur de propidi i es muntà els cubreobjectes sobre els portaobjectes amb el medi de muntatge no-fluorescent Fluoromount G. Les preparacions es van mantenir a temperatura ambient i a les fosques i en el termini màxim d'1 setmana van ser analitzades per microscopia confocal i de fluorescència.

7 Generació de clons estables en cèl·lules HEK293

Per l'obtenció de clons estables per la Ciclina O es van liniaritzar 15µg dels vectors pcDNA3-HA-Ciclina O i pcDNA3 amb l'enzim PvuI. Es va comprovar la digestió del DNA mitjançant electroforèsi en un gel d'agarosa a l'1% i es van tallar i purificar les bandes dels dos vectors liniaritzats. 1×10^6 cèl·lules HEK293 van ser transfectades amb cada vector mitjançant el mètode del fosfat de calci. Al mateix temps es va fer una transfecció idèntica amb el vector pEGFP per comprovar l'eficiència de transfecció

mitjançant citometria de flux. Després de la transfecció es van deixar les cèl·lules 30h en D-MEM amb un 10% de FCS per tal de facilitar-ne la recuperació. Basant-nos amb l'eficiència de transfecció obtinguda amb pEGFP es van tripsinitzar les cèl·lules i es van fer dilucions per tal d'obtenir clons cel·lulars provinents d'una única cèl·lula transfectada. Les cèl·lules sobrants es van mantenir en cultiu per tal d'obtenir el *pool* de cèl·lules transfectades. Tant els *pools* com els clons transfectats van ser tractats amb 1000µg/ml de l'antibiòtic geneticina durant la seva expansió per tal de seleccionar la presència del vector control pcDNA3 o el vector pcDNA3-HA-Ciclina O transfectats. Els clons que van créixer van ser analitzats mitjançant *Western Blotting* per detectar l'expressió de la proteïna HA-Ciclina O, i mitjançant assaig kinasa per tal de determinar la seva funcionalitat.

Tant les cèl·lules HEK293 parentals com els clons o els *pools* generats van ser cultivats en D-MEM amb un 10% de FCS a 37°C i 5% de CO₂. Periòdicament es van tripsinitzar i sembrar en medi nou abans d'arribat a un 90% de confluència. Aproximadament al passatge n°40, els cultius van ser substituïts per cultius nous a partir de cèl·lules congelades. En el cas de cultius nous dels clons o *pools* generats es va avaluar la seva resistència a la geneticina durant 48h abans d'iniciar un nou experiment.

8 Cultiu i generació de clons induïbles tet/ON en cèl·lules Baf3

Les cèl·lules hematopoiètiques necessiten la presència de citoquines pel seu continu creixement i supervivència. Les cèl·lules murines limfocítiques BaF3 són cèl·lules pre-B no transformades ni tumorogèniques que créixen en suspensió i mantenen la proteïna p53 *wild type* i la dependència de la citoquina IL3 (293). El cultiu d'aquestes cèl·lules i els clons generats posteriorment s'ha fet en medi RPMI amb un 10% de FCS a 37°C i 5% de CO₂. Com a font d'IL3 s'ha afegit un 2% de medi condicionat ric en IL3 secretada provinent d'un cultiu saturat de cèl·lules de mieloma comú X63 transfectades establement amb un vector d'expressió de la IL3 murina. Per mantenir correctament les cèl·lules Baf3 i els clons derivats en cultiu s'ha evitat sobrepassar la concentració de 2x10⁶ cèl·lules/ml crítica per la viabilitat cel·lular. Així, periòdicament s'ha diluït aquests cultius a 0,5x10⁶ cèl·lules/ml en medi nou amb un 2% de medi condicionat ric en IL3.

El sistema tet/ON aplicat en eucariotes es basa en els elements que regulen l'expressió dels gens de resistència a la tetraciclina en *E.coli* (124). Aquests, estan regulats negativament per la unió del repressor tetR (*tetracycline repressor*) a la regió operadora tetO (*tetracycline operator*), però en presència de l'antibiòtic tetraciclina aquesta unió no es dona i per tant, s'expressen els gens de resistència (124).

Fusionant el repressor tetR amb el domini C-ter de la proteïna viral VP16 (conegut per ser la regió essencial perquè es doni la transcripció immediata dels gens *early* en l'Herpes Simplex Virus) es va generar el transactivador sintètic, anomenat tTA (*tetracycline-controlled transactivator*). Igual que al repressor tetR, en absència de tetraciclina el transactivador tTA també s'uneix a les seqüències tetO però en aquest cas, enlloc d'inhibir, indueix l'expressió gènica (375).

Una mutació al tetR i la posterior fusió amb VP16 va permetre la formació del transactivador sintètic revers, anomenat rtTA (*reverse tetracycline-controlled transactivator*). L'avantatge d'aquest mutant és que es pot utilitzar amb un anàleg més estable de la tetraciclina, anomenat doxiciclina (Dox), i la seva unió a les seqüències tetO torna a activar l'expressió gènica només en presència de Dox (375).

Per aplicar el sistema tet/ON basat en l'rtTA a les cèl.lules Baf3 es va insertar el vector pTetNeo al genoma per expressar constitutivament aquest transactivador, donant lloc a la línia anomenada TonBaf. Posteriorment, el vector pTRE2Hyg-HA-Ciclina O que permet l'expressió de la proteïna HA-Ciclina O sota el control de les regions tetO va ser transfectat i inserit al genoma de les cèl.lules TonBaf. En aquestes condicions, l'addició puntual de Dox en presència del transactivador rtTA, provinent de l'expressió constitutiva del vector pTetNeo, provoca la inducció de l'expressió de la proteïna HA-regulada per les seqüències tetO del vector pTRE2Hyg-HA-Ciclina O.

Per generar aquest sistema al laboratori es disposà de cèl.lules Baf3 amb el vector pTetNeo (cèl.lules TonBaf, provinents del laboratori del Dr Steven Dowdy). 10^7 cèl.lules TonBaf van ser rentades en RPMI i resuspeses en 400µl de *cytomix*. Després d'una incubació durant 10min a 4°C van ser electroporades a 960mF i 250V amb 50µg dels vectors pTRE2Hyg control o pTRE2Hyg-HA-Ciclina O liniaritzats amb l'enzim de restricció Ahd I per tal de facilitar la seva recombinació i inserció al genoma. Immediatament després de l'electroporació les cèl.lules es van recuperar del xoc elèctric a 37°C i 5% de CO₂ en RPMI amb un 10% de FCS durant 24h. Tenint en compte l'eficiència màxima d'electroporació descrit per aquest protocol (0,01%) es van fer dilucions de les cèl.lules transfectades per tal d'aïllar clons únics. L'expansió d'aquests clons a 37°C i 5% de CO₂ en RPMI amb un 10% de FCS es va fer en presència de 1mg/ml de l'antibiòtic Higromicina B per seleccionar la incorporació dels vectors pTRE2Hyg o pTRE2Hyg-HA-Ciclina O electroporats. Els clons que van créixer van ser analitzats en absència i en presència de 2µg/ml de doxiciclina mitjançant RT-PCR i *Western Blotting* per detectar l'expressió induïda de l'mRNA i la proteïna HA-Ciclina O, i mitjançant assaig kinasa per determinar la seva funcionalitat. Els experiments d'RT-PCR i els assajos kinasa van demostrar que tots els clons pTRE2Hyg-HA-Ciclina O mantenien certa activitat kinasa degut a l'expressió basal d'HA-Ciclina O en absència de Dox. Per facilitar la comparació dels efectes en absència i presència de Dox es van escollir aquells clons amb menor activitat kinasa basal, sabent que tots ells presentaven un cert nivell d'activitat kinasa basal. Per evitar aquest problema, recentment s'han generat nous mutants rtTA disponibles que redueixen fins a 10 vegades els requeriments de Dox i l'expressió basal en la seva absència.

9 Obtenció i cultiu primari de cèl.lules MEF de ratolí

Per obtenir cultius de cèl.lules MEF amb els diferents genotips de p53 el cos dels embrions de ratolí de 13,5 dies (E13,5), provinents d'un creuament de ratolins heterozigots per p53 amb un fons genètic FVB/N, es va utilitzar per l'aïllament dels fibroblasts embrionaris, mentre que el cap s'utilitzà per fer-ne el genotipat.

Amb l'ajuda d'un escalpel es van disgregar els teixits de l'embrió immers en PBS i seguidament, amb una xeringa d'1ml i una agulla de 19G es van homogeneitzar forçant l'entrada i sortida diverses vegades a través de l'agulla. Posteriorment, cada embrió disgregat es va diluir en 15ml de PBS per rentar les cèl.lules. El *pellet* obtingut després d'una centrifugació de 5min a 1000rpm s'incubà durant 15min a 37°C amb 2ml de tripsina per acabar d'obtenir cèl.lules individuals. Aquesta suspensió cel.lular es va centrifugar per segon cop durant 5min a 1000rpm, i el *pellet* es va resuspendre en 10ml de D-MEM amb un 10% de FCS. La preparació de cèl.lules embrionàries es va sembrar en una placa de 100mm sobre un suport de 0,1% de gelatina i es va deixar creixent a 37°C aproximadament 5dies fins arribar a confluència. En aquestes condicions, les

úniques cèl.lules que s'adhereixen i créixen són fibroblasts primaris. Aquests foren expandits altra vegada en 3 plaques de 10mm, considerant aquest estadi com a passatge n°1. Després d'arribar a confluència per segon cop, els fibroblasts van ser tripsinitzats i congelats a -80°C fins el dia del seu ús, en que es van denominar cèl.lules MEF de passatge n°2.

Els experiments realitzats amb cèl.lules MEF es van dur a terme sembrant 2×10^6 cèl.lules en una placa de 100mm en 10ml de D-MEM i un 10% de FCS. Posteriorment es van mantenir a 37°C i 5% de CO₂ durant 24h abans del tractament pertinent. Els experiments es van realitzar sempre entre els passatges 3-8 per evitar la crisi proliferativa de les cèl.lules MEF descrita a partir dels passatges n°10-12.

10 Obtenció i cultiu primari de Timòcits

Per establir els cultius primaris de timòcits es van extreure timus de ratolí i es va mantenir immediatament a 4°C en medi de cultiu RPMI amb un 10% de FCS fins al moment de la disgregació del teixit. Sobre un filtre de 0,2µm de diàmetre i amb l'ajuda d'un èmbol de xeringa de 10ml es va procedir a la disgregació del timus immers en RPMI amb un 10% de FCS. Les cèl.lules resultants van ser recollides a través del filtre i van ser rentades en PBS i tractades amb *Red Blood Cell Lysing Buffer* durant 5min per eliminar els eritròcits. Es van fer dos rentats posteriors amb RPMI amb un 10% de FCS i s'establí el cultiu primari de timòcits a una concentració de 2×10^6 cèl.lules/ml en RPMI amb un 10% de FCS incubant-los a 37°C i 0,5% CO₂.

11 Citometria de flux

Per analitzar el cicle cel·lular i l'apoptosi les cèl.lules van ser tripsinitzades i rentades amb PBS en el cas dels cultius de cèl.lules adherides, i només rentades en PBS en el cas dels cultius en suspensió. Seguidament, es van resuspendre $0,5 \times 10^6$ cèl.lules en 200µl de PBS i aquestes es van fixar afegint 2ml d'etanol al 70% i mantenint-les a 4°C durant un mínim de 24h i fins a un màxim de 5 dies. Per determinar el grau d'apoptosi o la fase del cicle cel·lular, les cèl.lules fixades es van centrifugar eliminant completament l'etanol. El *pellet* cel·lular corresponent es va resuspendre en 0,5ml de PBS amb 50µg/ml de RNAsa i 5µg/ml de iodur propidi i aquestes mostres van ser incubades durant 30min a 37°C tenyint el DNA fluorescentment per fer-ne l'anàlisi posterior al citòmetre de flux.

Per quantificar l'expressió d'EGFP les cèl.lules van ser tripsinitzades i rentades amb PBS. Finalment es van resuspendre en PBS a una concentració d' 1×10^6 cèl.lules/ml per analitzar la seva fluorescència verda per citometria.

12 Aïllament de RNA

Els teixits indicats de ratolí van ser obtinguts i congelats immediatament en nitrogen líquid. Posteriorment es van mantenir a -80°C fins el dia de l'aïllament de l'RNA total. L'aïllament de l'RNA es va fer segons el protocol del reactiu comercial Trizol mantenint els teixits en tot moment a 4°C i homogeneitzant-los mitjançant un *douncer*. El *pellet* d'RNA total obtingut es va resuspendre en aigua *RNase free* i es va mantenir durant 30min a T°C ambient per facilitar la seva dissolució. La concentració es va determinar mesurant la densitat òptica a 260nm i es va comprovar l'estabilitat de l'RNA

total visualitzant l'estat dels mRNA ribosomals majoritaris (18S i 28S) separats per electroforesi en un gel a l'1,5% d'agarosa i tenyit amb 0,5µg/ml de bromur d'etidi. Finalment l'RNA quantificat es va mantenir a -80°C fins al dia del seu ús.

13 RT-PCR

A partir de l'RNA total aïllat de teixits o de cultius cel·lulars tractats es van determinar els nivells de l'mRNA de la Ciclina O de cada mostra per RT-PCR. Per assegurar que la quantificació de l'RNA total entre les mostres era la mateixa, també es van determinar els nivells constants del gen *house keeping hppt*.

Per la composició de la reacció de RT-PCR es va seguir el protocol recomanat en el kit comercial *Superscript One-Step RT-PCR with Platinum Taq* utilitzant un volum final de 25µl per cada reacció. Finalment es va utilitzar el mateix protocol amb el kit comercial *SuperScript III One-Step RT-PCR with Platinum Taq* observant un augment de la sensibilitat respecte el kit anterior. Les condicions de temps i temperatures utilitzades per amplificar la Ciclina O i l'HPRT, van ser les següents:

Extensió RT	1X	50°C	30min
Hot start	1X	95°C	5min
Deshibridació	40X	94°C	30sec
Anellament	40X	55°C	30sec
Extensió polimerasa	40X	68°C	1min
Extensió final	1X	68°C	10min

Amb 1µg d'RNA total de cada mostra i els oligonucleòtids RRE2E3-F (5'-CGCTTGCAAGCAGGTAGAGG-3') i RR3UTR-R (5'-CTACCTCGTGAGGACTTCG-3') es va amplificar una regió de l'mRNA de la Ciclina O que comprèn l'exó 3 complet i la zona no codificant 3' UTR. La primera meitat de la seqüència de l'oligonucleòtid RREXO23 hibrida amb l'exó 2, mentre que la segona meitat hibrida amb l'exó 3. D'aquesta manera s'evità l'amplificació de l'intró intermedi evitant també la interferència de possibles contaminacions de DNA genòmic en les mostres d'RNA total. En aquestes condicions l'única banda amplificada, de 750 nucleòtids, es correspon amb el tamany i la seqüència esperades.

Amb 1µg d'RNA total provinent de la mateixa dilució utilitzada en l'amplificació de la Ciclina O s'amplificà un fragment de l'mRNA d'HPRT amb els oligonucleòtids HPRT-F (5'-GGCCAGACTTTGTTGGATTTG-3') i HPRT-R (5'-TGCGCTCATCTTAGGCTTTGT-3'). En aquestes condicions l'única banda amplificada, de 150 nucleòtids, es correspon amb el tamany esperat.

14 Southern Blotting

Dels 25µl del producte final de cada RT-PCR 15µl van ser analitzats mitjançant electroforesi de DNA en un gel d'agarosa a l'1,5% tenyit amb 0,5µg/ml de bromur d'etidi. Les bandes amplificades van ser fotografiades i transferides a una membrana de nylon. Abans de cada transferència, els gels d'agarosa van ser tractats durant 45min amb una solució bàsica salina per tal de deshibridar les cadenes de DNA del productes

amplificats. Seguidament, es va neutralitzar el pH amb una incubació de 30min amb una solució neutralitzant.

La transferència es va fer en sec aprofitant la hidratació dels gels d'agarosa disposats basalment i a l'inrevés (amb els pous de càrrega a la cara inferior). La membrana de nylon d'un tamany idèntic al gel d'agarosa corresponent va ser prehidratada durant 5min amb aigua bidestil·lada i es va disposar en íntim contacte sobre el gel. Sobre la membrana es van apilar 15cm de papers absorbents de les mateixes proporcions a fi de crear un efecte de capilaritat que permeté la migració del DNA del gel a la membrana. Per facilitar aquest efecte es comprimí aquest muntatge amb 1kg de pes situat al cap de munt dels papers absorbents. La transferència es va deixar O/N a T°C ambient.

Després de la transferència la membrana de nylon es van sotmetre a 80°C durant 1h per fixar el DNA. Seguidament, es va re-hidratar amb aigua bidestil·lada durant 5min, i es va prehibridar amb la solució de prehibridació a 65°C durant 2h. Posteriorment es va afegir la sonda de la Ciclina O prèviament escalfada a 100°C durant 10min per deshibridar les cadenes dobles de DNA. La sonda es va obtenir prèviament a partir de l'amplificació per PCR de la regió codificant de la Ciclina O de ratolí amb els oligonucleòtids MBm5F (5'-GGAATTCCATGGTTACCCCTTGCCCTGCCAGCCC-3') i MBm5R (5'-CGGGATCCTTATTGCCAACTCTGGGGCAGGCTGCACC-3') i es va marcar radioactivament amb [α -³²P] dCTP seguint el protocol del *kit* comercial *HexaLabel DNA labeling*. Després de la hibridació, O/N a 65°C, es van fer tres rentats de 15min a 55°C amb la solució de rentat i es va submergir la membrana en aigua bidestil·lada durant 5min a temperatura ambient. Finalment, les bandes radioactives es van detectar i quantificar mitjançant autorradiografia.

15 Producció de proteïnes recombinants

Per la producció de proteïnes recombinants les bacterïes competents *E.coli* BL21 (DE3) pLysE van ser transformades amb els constructes indicats (**Taula 1**).

La soca bacteriana BL21 és deficient per les proteases *lon* i per les proteases *ompT* (outer membrane protease) evitant la degradació proteica durant la purificació. En aquest cas, la soca BL21 conté un fragment de DNA del bacteriòfag DE3 inserat al genoma d'*E.coli*, BL21 (DE3), que codifica pel gen de la T7 RNA polimerasa dirigit pel promotor *lacUV5* induïble per IPTG. A més, la soca BL21 (DE3) utilitzada també conté el vector pLysE que expressa el lisozim de la RNA polimerasa de T7. Aquesta enzima inhibeix parcialment l'activitat RNA polimerasa d'*E.coli* i totalment l'activitat de la RNA polimerasa de T7 en absència d'IPTG, evitant l'expressió basal de les proteïnes recombinants potencialment tòxiques o inhibidores del creixement bacterià fins el moment en que es dona l'addició d'IPTG. A la vegada, el lisozim facilita el protocol de purificació de la proteïna recombinant, ja que és capaç de degradar el peptidoglicà de la membrana externa de la bactèria.

L'expressió de la proteïna recombinant en els vectors procariotes indicats (**Taula 1**) està sota el control de la RNA polimerasa de T7. I com hem dit, l'expressió d'aquest enzim està controlada pels elements reguladors de l'operó *lac* d'*E.coli*. Així, l'addició d'IPTG al medi de cultiu actua inactivant el repressor LacI i conduïnt l'expressió de la RNA polimerasa de T7 amb la conseqüent transcripció i traducció dels constructes transfectats.

Les colònies transformades van créixer O/N a 37°C en plaques de medi LB amb 50µg/ml d'ampicilina, per tal de seleccionar la presència del constructe transformat, i

50µg/ml de cloranfenicol, per seleccionar la presència del vector pLysE. A partir d'una colònia fresca es va fer un preinòcul en 5ml de medi LB líquid amb els antibiòtics anteriors i es va deixar créixer O/N a 37°C amb una agitació constant de 200rpm. A partir de 3ml d'aquest preinòcul crescut es va fer un inòcul de 500ml que va créixer a 37°C amb una agitació constant de 200rpm durant 3h fins arribar a una densitat òptica, a una llongitud d'ona de 600nm, igual a 1. Seguidament es va afegir 1mM d'IPTG al medi per induir l'expressió de la proteïna recombinant i s'incubà el cultiu durant 3h a 37°C amb una agitació constant de 200rpm. Després de l'incubació amb IPTG es centrifugà el cultiu induït a 3500rpm durant 15min i el *pellet* de les cèl·lules bacterianes es va congelar a -80°C com a mínim 1h. Els *pellets* congelats es van resuspendre amb NTEN en presència del coctel d'inhibidors de proteases ALAS i es va sonicar el cultiu fins al trencament de les cadenes de DNA i la desaparició de la consistència mucosa del lisat. El lisat es va centrifugar a 10.000rpm durant 10min i el sobrenadant amb la proteïna recombinant es congelà a -80°C fins la seva utilització.

Constructes transfectats	Proteïna produïda
pGEX3X-Ciclina O	GST-Ciclina O
pMALc-Ciclina O	MBP-Ciclina O
pGEX2T-Ciclina A2	GST-Ciclina A2
pRP261-Ciclina D2	GST-Ciclina D2
pGEX2T-Ciclina D3	GST-Ciclina D3
pGEX2T-Ciclina G1	GST-Ciclina G1
pGEX3X-Ciclina I	GST-Ciclina I
pGEX-GFP	GST-GFP
pGEX3X	GST

Taula 1. Vectors transfectats per la producció de proteïna recombinant en BL21 (DE3) pLys E

16 Purificació de proteïnes recombinants

Per purificar les proteïnes recombinants fusionades a GST es va incubar el lisat bacterià que conté la proteïna recombinant amb boles de glutatió-sefarosa. Després d'una incubació de 3h a 4°C en constant rotació es van recollir les boles de glutatió-sefarosa i es van rentar 3 vegades en PBS per eliminar les restes del lisat. L'elució de les proteïnes recombinants fusionades a GST i unides a les boles de glutatió-sefarosa es va fer amb el tampó d'elució de GST incubant durant 30min a 4°C en constant rotació. Per la quantificació de les proteïnes recombinants purificades es va usar el reactiu de Bradford i es comprovà la integritat i la puresa de la proteïna mitjançant una electroforesi desnaturalitzant al 12,5% d'acrilamida amb SDS i una tinció posterior amb Coomassie Brilliant Blue R250.

Per purificar les proteïnes recombinants fusionades a MBP es va seguir el mateix protocol utilitzant boles de sefarosa unides a midó. En aquest cas, l'elució de les proteïnes recombinants unides a les boles de midó-sefarosa es va fer amb el tampó d'elució d'MBP durant 30min a 4°C en constant agitació.

17 Assajos de *Pull-Down*

Pels assajos de *Pull Down* es va incubar els lisats de proteïna recombinant provinents d'*E.coli* BL21(DE3) pLysE amb boles de glutatió-sefarosa o midó-sefarosa durant 3h a 4°C en rotació constant. Seguidament es van centrifugar les incubacions a 2000rpm durant 30sec i sense purificar la proteïna recombinant unida de les boles de sefarosa es van fer 3 rentats en NTEN en presència del coctel d'inhibidors de proteases ALAS. Finalment es van fer 3 rentats més amb la solució de lisi en presència del coctel d'inhibidors de proteases ALAS i en presència d'un coctel d'inhibidors de fosfatases.

Per quantificar la proteïna recombinant unida a les boles es van carregar diverses quantitats d'aquests complexos en un gel desnaturalitzant d'acrilamida al 12,5% que posteriorment es va tenyir amb el colorant Coomassie Brilliant Blue R250. La mateixa quantitat de cada proteïna recombinant unida a les boles de sefarosa es va incubar amb un lisat de 4×10^5 cèl·lules HEK293 (on s'expressa Cdk2) a 4°C durant 3h. Per obtenir aquests lisats, un *pellet* de 8×10^5 cèl·lules HEK293 congelades a -80°C van ser descongelades i homogenitzades amb solució de lisi en presència dels inhibidors de proteases ALAS i en presència dels inhibidors de fosfatases durant 30min a 4°C. Passat aquest temps es centrifugà l'homogenitzat a 13000rpm durant 20min a 4°C i s'obtingué el sobrenadant corresponent al contingut cel·lular total de 8×10^5 cèl·lules. La meitat d'aquest lisat es va utilitzar per la incubació del *Pull Down* descrit inicialment, mentre l'altra meitat s'usà per la incubació de l'assaig kinasa.

Després de la incubació amb el lisat cel·lular del *Pull Down* es van fer 3 rentats dels complexos units a les boles de sefarosa amb PBS i es va ressuspendre el *pellet* en tampó de càrrega 2X. La meitat de la mostra, equivalent a la interacció de la proteïna recombinant amb un lisat de 2×10^5 cèl·lules, es va escalfar a 95°C durant 10min i es va analitzar per PAGE-SDS per identificar la presència de Cdk2 per *Western Blotting*.

18 Immunoprecipitació / Assaig Kinasa

Per realitzar els experiments d'immunoprecipitació (IP) i assaig kinasa es va partir d'un lisat de 4×10^5 cèl·lules HEK293 en solució de lisi en presència del coctel d'inhibidors de proteases i dels inhibidors de fosfatases. Aquest lisat va ser incubat durant 3h a 4°C amb 0,2µg de l'anticòs purificat per afinitat (o 2µl de serum generat al laboratori) i 20µl de proteïna A o proteïna G unida a les boles de sefarosa. Després de la incubació, els complexos immunoprecipitats es van rentar 3 vegades amb *kinase buffer* i es van incubat immediatament amb 20µl de la solució Hot Mix durant 30min a 30°C per tal d'activar la reacció de fosforilació sobre la Histona H1. Finalment, la reacció de fosforilació s'aturà afegint el tampó de càrrega 2X. Una tercera part de cada mostra, equivalent al lisat de $1,3 \times 10^5$ cèl·lules HEK293, es va resoldre en un gel d'acrilamida al 12,5% amb SDS. Posteriorment, les proteïnes es van fixar i tenyir amb Coomassie Brilliant Blue R250 per tal d'identificar-les visualment en el gel d'acrilamida i aquest va ser assecat i exposat davant d'un film d'autoradiografia a -80°C per detectar la intensitat relativa de les bandes degudes a la transferència de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP de cada mostra.

19 Assajos d'activitat fosfatasa

La fosfatasa alcalina (CIAP) catalitza la hidròlisi de grups fosfat presents al DNA (units a l'extrem 5') i també de proteïnes (units als residus serina, treonina i tirosina en menor grau). A diferència de les fosfatases àcides, la CIAP pot ser utilitzada per experiments de defosforilació *in vitro* en un aspecte de pH òptim entre 8 i 9,5, evitant la desnaturalització de les proteïnes substrat.

Per determinar l'estat de fosforilació de la proteïna Ciclina O es va preparar un lisat de cèl·lules positives per l'expressió de la proteïna HA-Ciclina O en el tampó fosfatasa en presència del coctel d'inhibidors de proteases ALAS i en absència dels inhibidors de fosfatases. Com a controls també es van preparar lisats cel·lulars en absència d'HA-Ciclina O i lisats cel·lulars en presència dels inhibidors de fosfatases.

50µg de cadascun dels lisats preparats a 4°C van ser atemperats 10min a 30°C i posteriorment es van incubar 30min a 30°C en presència de 30 unitats de CIAP, o en un volum equivalent en el cas control. Finalment la reacció de defosforilació es va aturar afegint el tampó de càrrega 2X i es va determinar l'estat de fosforilació per *Western Blotting*.

20 Assajos d'activitat GSK3β

A partir de lisats bacterians es van purificar les proteïnes recombinants GST-GFP, GST-Ciclina D3 i GST-Ciclina O unides a boles de glutatió-sefarosa i es van quantificar en un gel d'electroforesi desnaturalitzant al 12,5% d'acrilamida mitjançant la tinció amb Coomassie Brilliant Blue R250.

Per determinar la fosforilació de GSK3β sobre aquestes proteïnes *in vitro* es van fer 3 rentats en *kinase buffer* de quantitats equivalents de cada proteïna recombinant unida a boles de glutatió-sefarosa. Aquests complexos es van resuspendre en el mateix volum de Hot Mix en absència d'Histona H1 i van ser incubats durant 30min a 30°C en presència o absència de 250 unitats de GSK3β. Finalment, la reacció de fosforilació s'aturà afegint el tampó de càrrega 2X i les mostres es van resoldre en un gel d'acrilamida al 12,5% amb SDS. Les proteïnes es van fixar al gel i es van tenyir amb el colorant Coomassie Brilliant Blue R250. El gel d'acrilamida tenyit es va assecat i va ser exposat en un film d'autoradiografia a -80°C per detectar la intensitat relativa de les bandes degudes a la transferència de ³²P de cada mostra.

21 Obtenció d'anticossos policlonals de conill

Per generar l'anticòs policlonal anti-Ciclina O, 200µg de la proteïna recombinant purificada MBP-Ciclina O dissolta en 500µl de PBS es van mesclar amb 500µl d'adjuvant MPL+TDM per incrementar la resposta immunològica del conill productur. El contingut total d'aquest compost antigènic va ser administrat en el conill en tres zones corporals diferents (2 x 200µl intramuscularment, 200µl intraperitonealment i 2 x 200µl als nòduls limfàtics submandibulars).

Les pautes d'administració van ser les següents:

Setmana 1	Sagnat control	Administració antigen
Setmana 3	/	Administració antigen
Setmana 5	/	Administració antigen
Setmana 6	Sagnat	/
Setmana 9	/	Administració antigen
Setmana 10	Sagnat	/

A partir de la setmana 5 es va repetir el procés d'injecció i sagnat mensualment fins la disminució de la resposta antigènica de l'animal. Els sagnats obtinguts van ser centrifugats (3000rpm 15min) per eliminar les cèl.lules sanguínies i el sèrum es tractà amb 50mM Tris-HCl pH 7,5 i 0,002% d'azida sòdica per tal d'evitar la proliferació de microorganismes contaminants. Immediatament després, el sèrum tractat va ser aliquotat i congelat a -20°C.

Periòdicament es va mesurar la titulació de l'anticòs de cada sagnat mitjançant el reconeixement de la proteïna GST-Ciclina O per ELISA. Per obtenir un sèrum control negatiu en el reconeixement de GST-Ciclina O, es va fer un sagnat preimmune del mateix animal abans de l'administració de la primera dosi antigènica (Setmana 1).

Fins al moment només podem determinar l'activitat kinasa associada a la proteïna HA-Ciclina O exògena mitjançant la immunoprecipitació amb l'anticòs anti-HA (fragment de la proteïna Hemaglutinina provinent del virus de la grip humana), ja que l'anticòs anti-Ciclina O generat no és plenament funcional per immunoprecipitar la Ciclina O i mantenir la seva activitat kinasa associada (**Taula 2**). Per tal d'aïllar aquesta activitat es van generar anticossos policlonals de conill contra fragments peptídics de la Ciclina O situats a les zones que, segons el model tridimensional dels complexos Cdk2-Ciclina A, no són crítiques per la interacció cdk-ciclina. Amb aquesta finalitat es va escollir dos fragments peptídics homòlegs entre la Ciclina O humana i de ratolí, anomenats N1 i C1. Segons el modelatge estructural de la Ciclina O (realitzat pel grup del Dr Jordi Villà) el pèptid N1 (H-LRAPVKKSRRPC-NH₂) està situat a la zona N-ter presumiblement menys estructurada de la Ciclina O, mentre que el pèptid C1 (H-FHPRESLARQPQVTAESRC-NH₂) forma part d'un *loop* a la cara externa de la proteïna estructuralment allunyat de la zona d'interacció amb les proteïnes cdk. Els pèptids N1 i C1 van ser conjugats amb l'haptè KLH per incrementar la seva capacitat immunogènica abans de la seva administració en conill seguint el mateix procediment d'immunització que l'utilitzat amb la proteïna de fusió MBP-Ciclina O. La titulació d'aquest anticossos en el sèrum també es va fer mitjançant ELISA, tot i que en aquest cas, la proteïnes adherides a la placa van ser els mateixos pèptids, N1 o C1 respectivament, conjugats amb Ovalbúmina.

Per verificar la funcionalitat dels sèrums generats en la producció d'aquests tres anticossos es van realitzar experiments de *Western Blotting* i experiments d'immunoprecipitació i assaig kinasa utilitzant lisats de cèl.lules positius per la sobreexpressió de la Ciclina O. Malauradament, els anticossos generats contra els pèptids N1 i C1 tampoc recuperen l'activitat kinasa associada de la Ciclina O, impeding la determinació de la seva activitat endògena (**Taula 2**).

	ELISA	WB	IP/ KA	IHC
Anti-Ciclina O	XXXXX	XXXX	X	XXX
Anti-N1	XXXXX	X	/	X
Anti-C1	XXXXX	XX	/	XXX
Anti-HA	No testat	XXXXX	XXXXX	No testat

Taula 2. Nivell de funcionalitat dels anticossos policlonals anti-Ciclina O, anti-N1 i anti-C1 en les tècniques d'ELISA, Western Blotting (WB), Immunoprecipitació/Assaig kinasa (IP/KA) i Immunohistoquímica (IHC). La valoració s'ha fet sobre una escala de 0 a 5 X.

21.1 Purificació de l'anticòs policlonal anti-Ciclina O

21.1.1 Rentat de la columna i unió del lligand GST-Ciclina O

2ml de sefarosa preactivada amb CNBr es van rentar en un tub amb 30ml de 1mM HCl. Seguidament es va deixar reposar la sefarosa i s'eliminà l'HCl sobrant. Al mateix temps, 5mg de la proteïna lligand (GST-Ciclina O) es van dissoldre en 3ml de coupling buffer i posteriorment s'afegiren al mateix tub de la sefarosa activada. Per afavorir la unió del lligand a la sefarosa s'incubà la mescla durant 2h a 4°C en constant rotació. Després, es va deixar el tub en repòs i s'eliminà la proteïna sobrant rentant la sefarosa unida al lligand amb 5ml de coupling buffer. Els grups CNBr lliures de la sefarosa van ser bloquejats amb 10ml de 0,1M Tris-HCl pH 8 durant 2h a T°C ambient. Finament, s'eliminà la solució bloquejant amb tres rentats alternant les solucions 0,1M NaHCO₃, 0,5M NaCl pH 4 i 0,1M Tris-HCl, 0,5M NaCl pH 8 i s'empaquetà la sefarosa unida al lligand en una columna.

21.1.2 Elució de l'anticòs anti-Ciclina O

Inicialment, la columna es va rentar amb 10mM Tris-HCl pH 7,5 i es van fer recircular 4ml d'una dilució ¼ del sèrum amb 10mM Tris-HCl pH 7,5 durant 5 vegades consecutives. Després de l'última passada es va fer un rentat amb 8ml de 10mM Tris, 0,5M NaCl pH 7,5 per desfer les unions inespecífiques i es va eluir l'anticòs unit amb 8ml de 100mM glicina-HCl pH 2,5. Immediatament, s'ajustà el pH de l'eluit a 7,5 amb 1M Tris i s'hi afegí 1% BSA i 0,01% d'azida sòdica per mantenir-lo estable a -20°C. La sefarosa activada amb CNBr es va rentar amb 30ml de 10mM Tris-HCl pH 7,5 i seguidament amb 8ml de 10mM trietanolamina pH 7,5 preparada al moment. La columna es va mantenir a 4°C amb 10mM Tris-HCl a pH 7,5 i 0,01% d'azida sòdica fins el seu pròxim ús.

21.2 Conjugació del pèptid C1 a KLH (amb MBS)

Per activar la KLH primerament es van dissoldre 1,5mg de MBS en 150µl de DMF i després s'afegí 5mg de l'haptè KLH. La reacció d'activació es deixà 30min a T°C ambient i posteriorment es purificà la proteïna KLH activada amb MBS a través d'una columna de sefarosa (sepharose G-25). La columna s'eluí amb 50mM de fosfat de sodi pH 6 i es mesurà l'absorbància de les primeres alíquotes a 280nm per determinar les fraccions positives per la KLH activa. Sobre l'eluit positiu s'afegí 5mg del pèptid C1 i s'ajustà el pH a 7,5 amb 0,1M NaOH. La reacció de conjugació es va deixar a T°C ambient durant 3h en agitació constant i finament, es dialitzà el conjugat amb 10mM NH₄HCO₃ durant 3 dies.

21.3 Conjugació del pèptid N1 a KLH (amb Glutaraldehyd)

Per separar es van dissoldre 5mg de pèptid N1 en 375µl de 0,1N AcOH i 5mg de KLH amb 0,5ml de 100mM tampó fosfat pH 7,5. Es van ajuntar les dues dissolucions i es va ajustar el pH a 7,5 amb NaOH 0,1M. Durant 5min a T°C ambient s'afegí lentament 1ml de 0,2% de glutaraldehyd dissolt en H₂O sobre la mescla de pèptid N1 i KLH. La reacció de conjugació es va deixar durant 30min i posteriorment es van bloquejar els grups lliures amb 250µl de glicina 1M. Aquesta reacció de bloqueig es va mantenir durant 30min i finalment es va dialitzar el conjugat amb 10mM NH₄HCO₃ durant 3 dies.

21.4 Purificació dels anticossos policlonals anti-N1 i anti-C1

21.4.1 Activació de la columna amb MBS

5ml de sefarosa es van empaquetar i rentar primerament amb 50ml de 0,5M NaCl i després amb 50ml de tampó fosfat. Aquesta columna de sefarosa es va activar recirculant una solució d'activació que conté MBS durant 2h. Per eliminar l'MBS sobrant no conjugat es va fer un primer rentar amb 50ml de tampó fosfat:DMF en una relació 4:1, i un segon rentar amb 50ml tampó fosfat.

21.4.2 Unió del pèptid C1 i N1 a la columna de sefarosa-MBS

Per unir els pèptids a la sefarosa es van fer recircular 5mg de pèptid (C1 o N1) dissolts en 5ml de tampó fosfat durant 5h a T°C ambient per la columna de sefarosa activada. Seguidament, es va rentar la columna amb 50ml de tampó fosfat per eliminar els pèptids no conjugats i es va bloquejar els grups MBS lliures recirculant 25µl de β-mercaptoetanol en 10ml de tampó fosfat durant 4h. Finalment es va fer un rentat de la columna de sefarosa amb tampó fosfat abans d'iniciar el procés de purificació.

21.4.3 Elució dels anticossos anti-N1 i anti-C1

La columna es va rentar amb 10mM Tris-HCl pH 7,5 i es van passar 10ml d'una dilució ¼ del sèrum amb 10mM Tris-HCl pH 7,5 durant 5 vegades consecutives. Després de l'última passada es va fer un rentat amb 20ml de 10mM Tris-HCl pH 7,6, 500mM NaCl, per desfer les unions inespecífiques i s'eluí l'anticòs unit a la columna amb 10ml de 100mM glicina-HCl pH 2,5. Immediatament s'ajustà el pH de l'eluit a 7,5 amb 1M Tris i s'hi afegí 1% de BSA i 0,01% d'azida sòdica per mantenir-lo estable a -20°C. La sefarosa activada es va rentar amb 30ml de 10mM Tris-HCl pH 7,5 es va mantenir a 4°C amb 10mM Tris-HCl a pH 7,5 i 0,01% d'azida sòdica fins el seu pròxim ús.

22 ELISA

22.1 Conjugació dels pèptids C1 i N1 a Ovalbúmina

Per la conjugació del pèptid C1, o N1, amb Ovalbúmina es va dissoldre 3mg del pèptid en 500µl de PBS i 6mg d'Ovalbúmina en 200µl de PBS. Ambdues dissolucions es van ajuntar i es van mantenir a 4°C durant tot el procés. Cada 30min es va afegir

200µl de PBS amb 0,08% de glutaraldehyd a la mescla peptídica anterior fins arribar a una concentració final de 0,05% de glutaraldehyd (quan el volum afegit és de 1,2ml). En aquest punt es manté la mescla O/N a T°C ambient i el dia següent es va dialitzar en PBS durant 24h. Finalment, es va analitzar la concentració del pèptid conjugat a Ovalbúmina mitjançant el reactiu de Bradford.

22.2 Adsorció

La proteïna MBP-Ciclina O, o els pèptids N1 i C1 conjugats amb Ovalbúmina, es van diluir a una concentració de 20µg/ml en PBS i es van distribuir en 50µl/pou sobre una placa de 96 pous de poliestirè de fons pla. Per tal que l'antigen s'adherixi a la seva superfície s'incubà la placa durant 60min a 37°C. Després de la incubació s'eliminà el sobrenadant sobrant, es van fer tres rentats en PBS, i es va bloquejar la superfície lliure afegint 100µl/pou d'1% gelatina en PBS a 37°C durant 30min.

22.3 Hibridació

S'eliminà la gelatina i sense fer rentats es van afegir 50µl/pou de diferents dilucions dels serums en PBS amb 0,1% Tween. Seguidament, s'incubà la placa a 37°C durant 60min i després es van fer tres rentats en PBS amb 0,1% Tween per eliminar el sèrum sobrant. Posteriorment es van afegir 50µl de l'anticòs secundari anti-rabbit conjugat amb fosfatasa alcalina (AP) i diluït 1/1000 en PBS amb 0,1% Tween. L'anticòs secundari s'incubà durant 60min a 37°C i es fan tres rentats en PBS amb 0,1% Tween per tal d'eliminar-ne l'excés. Finalment, s'afegí el substrat fluorescent, 1mg/ml 4-MUP en 1M trietanolamina pH 9,5, i s'incubà la reacció a T°C ambient durant 30min. La fluorescència es va llegir al citofluorímetre a una longitud d'ona d'excitació de 360nm i una longitud d'ona d'emissió de 460nm.

23 Electroforesi desnaturalitzant i *Western Blotting*

23.1 Preparació de les mostres

Les mostres a analitzar per electroforesi desnaturalitzant i *Western Blotting* van ser quantificades prèviament pel mètode de Bradford. 50µg de proteïna de cada mostra es van resuspendre en el tampó de càrrega 2X i es van escalfat a 95°C durant 10min. Posteriorment, la mostra es va incubar a 4°C durant 1min i es va centrifugar durant 1min a 3000rpm per recollir-ne la seva totalitat. El mateix volum de cada mostra va ser carregat en un gel desnaturalitzant al 12,5% d'acrilamida. Les electroforesi es van resoldre a 150volts constants durant 2h.

23.2 Transferència

Per la transferència de les proteïnes a una membrana de nitrocel·lulosa es va muntar un sistema en *sandwich* immers dins el tampó de transferència on es disposen el gel i la membrana en íntim contacte fent coincidir el gel amb el pol negatiu i la membrana amb al pol positiu d'un camp elèctric. Aplicant un amperatge constant de 400mA i un voltatge màxim de 150volts durant 1 hora les proteïnes carregades negativament gràcies a la unió uniforme amb SDS van migrar, en funció de la seva càrrega, en direcció a la membrana. L'eficiència de la transferència es va comprovar mitjançant la tinció proteica de la membrana transferida amb el colorant Ponceau S.

23.3 Hibridació

La membrana transferida es va prehibridar durant un mínim de 30min a T°C ambient amb la solució de bloqueig que conté un 5% de llet desnatada en pols en TBS-Tween. La membrana bloquejada es va incubar durant 1h amb l'anticòs primari pertinent diluït en solució de bloqueig (**Taula 3**). Posteriorment es van fer 3 rentats de 5min cadascun amb TBS-Tween per eliminar l'anticòs primari sobrant i es va incubar la membrana durant 1h amb una dilució de l'anticòs secundari conjugat amb HRP també en solució de bloqueig. Després de 3 rentats de 5min cadascun amb TBS-Tween la membrana es va posar en contacte durant 1min amb el reactiu comercial ECL que conté el substrat de l'HRP. Finalment, es va detectar la intensitat de la fluorescència del producte final mitjançant l'exposició de la membrana a una pel·lícula autorradiogràfica.

	Font	Fabricant	Dilució	Temps/T°C d'incubació
Anti-Ciclina O	Conill (policlonal)	Sèrum propi purificat	1/500	1h T°C ambient
Anti-HA	Ratolí (monoclonal)	Hibridoma 12CA5 purificat	1/1000	1h T°C ambient
Anti-Cdk1	Ratolí (monoclonal)	Pharmlingen	1/1000	1h T°C ambient
Anti-Cdk2	Conill (policlonal)	Santa Cruz (M2)	1/2000	1h T°C ambient
Anti-Ser15 p53	Conill (policlonal)	Cell Signaling	1/1000	1h T°C ambient
Anti-Bax	Conill (policlonal)	Santa Cruz (N-20)	1/1000	1h T°C ambient
Anti-p21	Conill (policlonal)	Santa Cruz (C-19)	1/1000	1h T°C ambient
Anti-Ser139 H2AX	Ratolí (monoclonal)	Upstate (clon JBW301)	1/1000	1h T°C ambient
Anti PCNA	Ratolí (monoclonal)	Calbiochem (clon Ab-1)	1/1000	1h T°C ambient
Anti Tubulina	Ratolí (monoclonal)	Sigma (clon DM1A)	1/3000	1h T°C ambient

Taula 3. Característiques dels anticossos utilitzats per *Western Blotting*

24 Immunohistoquímica (IHC)

24.1 Preparació dels teixits

Els teixits de ratolí van ser fixats immediatament en paraformaldehid al 4% a 4°C durant una setmana i posteriorment van ser deshidratats en incubacions successives en etanol al 70%, 90%, 100% i finalment en xilè. Els teixits deshidratats van ser impregnats en parafina a 60°C O/N i després es van refredar muntant els blocs parafinats per fer-ne talls de 3µm de gruix que foren disposats sobre portaobjectes silanitzats. Seguidament els talls van ser desparafinats a 60°C durant 30min i es van rehidratar en incubacions successives en xilè, etanol al 100%, 90%, 70% i finalment en aigua destil·lada. Els talls re-hidratats es van bullir durant 10min en 0,01M NaCO₂H pH 6 per afavorir la recuperació antigènica i després de rentar-los en aigua i PBS es va fer una postfixació tractant-los durant 10min amb acetona a -20°C per mantenir l'exposició dels epitops. Posteriorment es van fer 2 rentats en PBS i es va inhibir l'activitat peroxidasa endògena amb un 4% d'H₂O₂ en PBS durant 10min afegint-hi també un 0,1% d'azida sòdica per evitar la formació de bombolles. Finalment es van fer dos rentats de 5min cadascun en PBS.

24.2 Incubació

Primerament es va fer un bloqueig de les interaccions inespecífiques tractant les preparacions de teixit durant 20min en una solució filtrada de 5% llet, 0,04% tween en PBS. Seguidament es van incubar durant 90min a 27°C amb l'anticòs primari diluït en PBS amb 1% BSA. Després de 6 rentats en PBS per eliminar l'excés de l'anticòs primari s'incubà 60min a 27°C amb l'anticòs secundari conjugat amb HRP i amplificat amb el sistema comercial Envision. Per eliminar la resta d'anticòs secundari no unit es van fer 5 rentats en PBS i després es revelà les mostres amb el substrat DAB durant 5min. Per reconèixer les estructures tissulars es va fer una tinció durant 5min amb una solució filtrada d'hematoxilina al 20% en PBS i passat aquest temps s'eliminà l'excés de colorant fent un rentat en aigua corrent. Posteriorment, les preparacions es van rehidratar fent incubacions successives en etanol al 50%, 70%, 100% i en xilè. Finalment, es van muntar els cubreobjectes i es van segellar amb DPX.

25 Informació suplementària

Inicials	Significat
AP	Alkaline Phosphatase
BES	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid
BSA	Bovine Serum Albumin
Cbz-LLnL	Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal
CIAP	Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal
D-MEM	Dubelcco's modified minimum essential medium
DMF	N,N,dimetil formamide
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	Ethyleneglycoltetraacetic acid
FCS	Fetal Calf Serum
GST	Glutathione-S-transferase
HEK293	Human Embrionic Kidney
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid
HPRT	Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase
HRP	HorseRadish Peroxidase
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
KLH	Hemocyanin from Keyhole Limpets
MBP	Maltose Binding Protein
MBS	m-maleimido benzoic acid n-hydroxysuccinimide ester
MEF	Mouse Embryo Fibroblasts
MUP	4-Methylumbelliferyl Phosphate
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyde
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SSC	Standard Saline Citrate
STI	Soybean Trypsin Inhibitor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane

Taula 4. Abreviatures de productes i reactius utilitzats

Producte	Fabricant
Actinomicina D	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Adjuvant MPL+TDM	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63178, USA
Ampicilina	Roche, Grenzacherstrasse 124 CH-4070 Basel Switzerland
Anticòs secundari anti-conill-AP	DAKO, DK-2600 Glostrup Denmark
Anticòs secundari anti-conill-Envision-HRP	DAKO, DK-2600 Glostrup Denmark
Anticòs secundari anti-conill -HRP	DAKO, DK-2600 Glostrup Denmark
Anticòs secundari anti-ratolí-HRP	DAKO, DK-2600 Glostrup Denmark
Anticòs secundari anti-rata-HRP	DAKO, DK-2600 Glostrup Denmark
BigDye Terminator v3.1	Applied Biosystems, Warrington WA1 4SR, UK
Boles de glutatió-sefarosa	Glutathione Sepharose 4B, Amersham Biosciences AB, SE-75184 Uppsala, Sweden
Cafeïna	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Cbz-LLnL (MG132)	EMD Biosciences, Inc.10394 Pacific Center Court San Diego, CA92121 US
Cicloheximida	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Cloranfenicol	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Coomassie Brilliant Blue R-250	Bio-Rad Laboratories, 1000 Alfred Nobel Drive Hercules, CA 94547
DAB	DAKO, DK-2600 Glostrup Denmark
DMF	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Doxiciclina	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
DPX	BDH Chemicals, Poole, UK
ECL	Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, England HP7 9NA
Filtre de 0,2µm de diàmetre	Millipore, 290 Concord Rd.Billerica, MA 01821
Fluoromount G	Southern Biotechnology Associates, Birmingham AL 35226, USA)
Geneticina	GIBCO/BRL, Grand Island, NY
GSK3β	Glycogen Synthase Kinase 3β, New England Biolabs 240 County Road Ipswich, MA 01938-2723
HexaLabel DNA labeling	Fermentas, Canada, 830 Harrington Court, Burlington, Ontario L7N 3N4
Histona H1	Roche, Grenzacherstrasse 124 CH-4070 Basel Switzerland
Higromicina B	Invitrogen, Carlsbad, CA 92008
Iodur de Propidi	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
IPTG	Promega, Madison WI, USA

LiCl	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
MBS	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Membrana de nitrocel·lulosa	Protran, Schleicher & Schuell GmbH, D-37582 Dassel, Germany
Membrana de nylon	Zeta-Probe, Bio-Rad, 2000 Alfred Nobel Drive, Hercules CA 94547
Microesferes de poliestirè	Flow-Count Fluorospheres, Beckman Coulter France S.A. 95942 Roissy, CDG
Nocodazol	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
NP40	EMD Biosciences, Inc. 10394 Pacific Center Court San Diego, CA92121 US
4-MUP	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63178, USA
Ovalbúmina	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63178, USA
Peròxid d'hidrògen 30% H ₂ O ₂	EMD Biosciences, Inc. 10394 Pacific Center Court San Diego, CA92121 US
Placa de 96 pous de poliestirè de fons pla	NUNC MaxiSorp™ High Protein-Binding Capacity, eBioscience, 6042 Cornerstone Court West San Diego, CA92121 USA
Ponceau S	Millipore, 290 Concord Rd. Billerica, MA 01821
Proteïna G sefarosa	Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden
Proteïna A sefarosa	Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden
Reactiu de Bradford	Bio-Rad GmbH, Munchen, Germany
<i>Red Blood Cell Lysing Buffer</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63178, USA
Roscovitina	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Sefarosa-EAH	EAH Sepharose 4B, Pharmacia
Sefarosa-CNBr	CNBr-activated Sepharose 4B, Pharmacia Biotech
Solució de Papanicolau 1a (hematoxilina)	Merck & Co., Inc. One Merck Drive P.O. Box 100 Whitehouse Station, NJ 08889-0100 USA
Superscript One-Step RT-PCR with Platinum Taq	Invitrogen, Carlsbad, CA 92008
SuperScript III One-Step RT-PCR with Platinum Taq	Invitrogen, Carlsbad, CA 92008
Trizol	Invitrogen, 1600 Faraday Ave., Carlsbad CA 92008, USA
Trypan Blue	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA

Taula 5. Relació de fabricants i reactius utilitzats

Solució	Composició
ALAS 1X	(2µg/ml Aprotinina, 2µg/ml Leupeptina, 2µg/ml Antipaïna, 20µg/ml STI)
BBS 2x	(50mM BES, 280mM NaCl, 1,5mM Na ₂ HPO ₄ pH 6,95 en H ₂ O i ajustar el pH a 6,95 amb 1M NaOH)
Coupling buffer	(0,1M NaHCO ₃ pH 8,3, 0,5M NaCl)
Cytomix	(120mM KCl, 0,15mM CaCl ₂ , 10mM K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ pH 7,6, 25mM HEPES pH 7,6, 2mM EGTA pH 7,6, 5mM MgCl ₂ , 5mM Glutatió, 2mM ATP)
50X Denhard	0,5l (5gr Ficoll type 400, 5gr polyvinylpyrrolidone, 5gr BSA, H ₂ O fins 500ml)
Hot Mix	(50mM Tris-HCl pH=7,5, 10mM MgCl ₂ , 20µM ATP, 10 µCi [γ- ³² P] dATP, 1mM DTT i 2µg Histona H1 per reacció)
Inhibidors de Fosfatasas	(1mM NaF, 1mM β-glicerofosfat, 1mM pirofosfat sòdic, 0,2mM ortovanadat sòdic).
NTEN	(20mM Tris-HCl pH=8, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 0,5% NP40, 1mM DTT)
PBS	(100mM Na ₂ HPO ₃ /NaH ₂ PO ₃ , 125mM NaCl, pH 7,2)
Solució d'activació	5ml (2500µl DMF/25mg MBS fins a 5ml amb tampó fosfat)
Solució bàsica salina	(1,5M NaCl, 0,5M NaOH)
Tampó Fosfatasa	(50mM Tris-HCl pH=8,8, 150mM NaCl, 10mM MgCl ₂ , 0,5% NP40, 1mM DTT)
<i>Kinase buffer</i>	(50mM Tris-HCl pH=7,5, 10mM MgCl ₂ , 1mM DTT)
Solució de Lisi	(50mM Tris-HCl pH=7,5, 150mM NaCl, 20mM EDTA, 0,5% NP40, 1mM DTT)
Solució neutralitzant	(1M Tris-HCl pH 7,4, 1,5M NaCl).
Solució de prehibridació	(6X SSC, 5X Denhard's reagent, 0,5% SDS, 100µg/ml DNA d'esperma de salmó fragmentat i desnaturalitzat)
Solució de Rentat	(0,1% SDS, 1X SSC)
20X SSC	1l (175,3gr NaCl, 88,2gr Sodium Citrat fins 800ml H ₂ O. Ajustar el pH a 7 amb 10M NaOH.
Tampó de càrrega 2X	(4% SDS, 300mM β-mercaptoetanol, 125mM Tris-HCl pH=6,8, 10mg/ml de blau de bromofenol)
Tampó d'elució GST	(100mM Tris-HCl pH=8, 120mM NaCl, 20mM glutatió reduït)
Tampó d'elució MBP	(100mM Tris-HCl pH=8, 120mM NaCl, 20mM maltosa)
Tampó fosfat	(0,1M Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O pH 7,5)
Tampó de transferència	(20% metanol, 25mM Tris Base, 200mM glicina)
TBS-Tween	(20mM Tris pH 7,6, 137mM NaCl, 0,05% HCl, 0,1% Tween 20)

Taula 6. Composició dels tampons i solucions usades

IV. Capítols Temàtics

Objectiu:

**1-Identificació i clonatge de noves ciclines
candidates a ser l'activador apoptòtic de Cdk2**

Capítol 1. Identificació *in silico* i clonatge de la Ciclina O

1 Resultats

1.1 Identificació *in silico* d'una nova ciclina

La seqüenciació completa del genoma de ratolí i la seva anàlisi ha aportat una quantitat enorme d'informació que posa al descobert nous gens fins al moment desconeguts. La similitud d'aquests nous gens amb els anteriorment descrits és usada a l'hora de predir la funció de les noves proteïnes. Aquestes mesures de similitud es basen en l'homologia entre les seqüències proteïques i la predicció de dominis estructurals i funcionals, però cal tenir en compte que tota la informació extreta a través de comparacions amb gens de funció coneguda és vàlida per conèixer la funció d'un nou gen o proteïna, però no és suficient. En molts casos, una família gènica pot ser definida per la conservació d'un motiu en la seva seqüència o d'un domini en la seva estructura, tanmateix, la presència d'aquest domini comú no confereix necessàriament una funció idèntica. Per aquest motiu l'assignació d'una funció biològica a una nova proteïna, malgrat les indicacions *in silico*, han de ser confirmades experimentalment.

La primera força motriu en el procés de replicació de la cèl.lula ve donada per l'activitat serina/treonina kinasa dels complexos ciclina-cdk. Les ciclins són les subunitats reguladores d'aquests complexos, mentre que les CDK en són les subunitats catalítiques (267,339). Les combinacions específiques pel que fa a la composició de les dues subunitats d'aquests complexos fan possible la progressió d'una fase a la següent en el cicle cel.lular i l'activació de les funcions de la cdk corresponent.

En el cas particular d'un dels membres de la família cdk, la proteïna Cdk5, la subunitat reguladora identificada fins al moment no sembla tenir homologia amb la família de les ciclins (178). Malgrat aquest cas, en aquest treball s'ha proposat com a hipòtesi principal l'existència d'una nova proteïna amb homologia a la família de ciclins com a subunitat activadora de Cdk2 en apoptosi.

La família cdk-ciclina conté cinc membres cdk (Cdk1, 2, 3, 4 i 6) i quatre classes de ciclins (Ciclina A, B, D i E) que regulen el cicle cel.lular. Tres cdks (Cdk 7, 8 i 9) i tres classes de ciclins (Ciclina C, H i T) regulen la transcripció, però hi ha altres membres d'aquestes famílies amb funcions que encara no han estat caracteritzades (**Taula 1**).

Ciclina	Cdk	Funció
		Cicle cel.lular
E1,2	Cdk2, Cdk3	Implicades en replicació del DNA i duplicació del centrosoma. La funció i les subunitats de Cdk3 encara estan poc definides.
A1,2	Cdk1, Cdk2	Funció en la replicació del DNA i en l'inici de la mitosi.
B1,2	Cdk1	Essencial per la mitosi
B3	?	A diferència de les Ciclins B1 i B2 entra al nucli durant la interfase. Funció desconeguda.
D1,2,3	Cdk4, Cdk6	Necessàries per l'inici de G1 en el cicle cel.lular
F	?	Unió descrita amb la Ciclina B. Fluctua durant el cicle cel.lular. Restringida a vertebrats?
J	Cdk2	Regula l'entrada a la mitosi. Aparentment restringida a <i>Drosophila</i> .
		Transcripció

H	Cdk7	Responsable de la fosforilació activadora d'altres complexos Cdk/Ciclina. Modifica la maquinària transcripcional.
C	Cdk8	Fosforila el domini C-terminal de la subunitat gran de la RNA polimerasa II.
T1,2a,2b	Cdk9	Forma el Transcription elongation factor (Tef-2b). La unió de la Ciclina T1 a la proteïna Tat de l'HIV és necessària per la unió eficient a l'element Tar de l'RNA de l'HIV.
K	?	S'associa a l'activitat kinasa sobre el domini C-ter de la subunitat gran de la RNA polimerasa II. Abundant en cèl.lules germinals.
		Altres/Desconegudes
p35	Cdk5	Proteòlisi de p35 associada a malalties neurodegeneratives. Descrita en neurones postmitòtiques.
?	Cdk10	Desconeguda
?	PCTAIRE	Desconeguda
?	PFTAIRE	Desconeguda
?	PITSLRE	Desconeguda, possible inducció de l'apoptosi
G1,2	?	Induïdes per estímuls apoptòtics. Associació descrita amb Cdk5. Restringida a vertebrats?
I		Desconeguda, similar a la Ciclin G
L1,2	Cdk12	Regulació de l' <i>splicing</i> alternatiu.
M	?	Homologia amb les ciclins amb funció transcriptional.
O	?	Descrita com Uracil-DNA glycosylasa. Homologia amb les ciclins.
P	?	Relativament distant a les Ciclins A i B. Funció desconeguda. Restringida a vertebrats?

Taula 1. Resum de les ciclins i cdk's en metazoos. La classificació de proteïnes que no tenen una subunitat coneguda és provisional. Taula extreta de Murray et al. 2001 (268).

Tots els membres cdk tenen un elevat grau d'homologia entre ells i han estat ben estudiats anteriorment (228). En el cas de les ciclins s'ha optat per incloure dins la mateixa família a totes aquelles proteïnes que mantenen una homologia significativa amb la seqüència conservada *cyclin box*, indistintament de la seva funció. Això fa que la seqüència dels diferents membres d'aquesta família no es mantingui tan conservada, fet que dificulta la identificació de totes les ciclins existents (103,228).

Fins al moment (**Taula 1**) no s'han identificat nous membres de la família de les ciclins que puguin actuar com activadors de Cdk2 en apoptosi (228,267). Per tal d'aïllar possibles candidats per aquesta funció es va comparar un fragment de la Ciclina A2 humana que inclou la seqüència *cyclin box* (residus 200-360) amb el genoma humà recentment seqüenciat mitjançant el programa tBlastn disponible a la web del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). L'anàlisi d'aquesta comparació ha permès identificar tots els membres descrits fins al moment i diferents pseudogens de les Ciclins B1, B2, D3, L1 i L2 corresponent a versions gèniques amb o sense introns, amb la pauta de lectura alterada i en alguns casos posicionats en altres regions cromosòmiques (103,268).

La comparació d'aquest fragment peptídic amb el genoma també va identificar un gen similar a l'inscrit a la base de dades amb el número d'accés M87499. M87499 fou descrit inicialment l'any 1991 com a codificant per la proteïna UDG *cyclin-like* (AAB05817) (260), i més recentment s'ha denominat Ciclina O per la seva homologia amb la família de les ciclins (**Taula 1**) (103,228,267,268).

El gen identificat al nostre laboratori conté una seqüència idèntica al genoma humà i es localitza a la mateixa posició cromosòmica descrita anteriorment pel gen M87499. Tanmateix, la seqüència del gen M87499 no segueix fidelment la seqüència del genoma humà, i el producte d'ambdós gens no és el mateix. Aquests resultats indiquen que la seqüència del gen M87499 és errònia i suggereixen el nou gen identificat recentment al nostre laboratori com a veritable gen de la Ciclina O (**Figura 1**).

(A partir d'aquest moment, en aquest treball s'anomena **M87499** al gen identificat l'any 1991 (260) i classificat posteriorment com a gen *ciclina O* responsable de la síntesi de la proteïna UDG *cyclin-like* (AAB05817) (268), i anomenem ***ciclina O*** al nou gen identificat recentment al nostre laboratori).

AAB05817 vs hCiclina O					
AAB05817	89	QVTAESRCKLLSWLIPVHRQFGLSFESLCLTVNTLDRFLTTTTVLQXXXXXXXXXXXXX	148		
		QVTAESRCKLLSWLIPVHRQFGLSFESLCLTVNTLDRFLTTTTPV			
Ciclina O	127	QVTAESRCKLLSWLIPVHRQFGLSFESLCLTVNTLDRFLTTTTVAADCFQLLGVTSLLIA	186		
AAB05817	149	XNRCTRR--AWKQLLALCCGAFSRQQLCNLECI RAAQAALHPGCATISFFLT-FQHL---	202		
		+ KQLLALCCGAFSRQQLCNLECI +G TISFFL F H			
Ciclina O	187	CKQVEVHPPRVKQLLALCCGAFSRQQLCNLECI VLHKLHFTLGAPTISFFLEHFTHARVG	246		
AAB05817	203	LSAARPPKLWKRKPWRRGV AELSLADYAFTSYSPSLLAICC	243		
		A + + + RGV AELSLADYAFTSYSPSLLAICC			
Ciclina O	247	AGQAEASEALEAQALARGVAELSLADYAFTSYSPSLLAICC	287		

Figura 1. Comparació de la proteïna AAB05817 (hUDG *cyclin-like*) amb el producte del gen *hCiclina O* identificat. Programa Blast 2 sequences de l'NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

1.2 Clonatge de la Ciclina O

Mitjançant el programa Blastn disponible a la web del NCBI, la comparació del locus genòmic on hem identificat el gen de la Ciclina O (5p15.2-p13.1) amb les ESTs humanes disponibles ha permès identificar múltiples ESTs (p.ex.: BQ917277, BI259616, BE206795) amb un marc obert de lectura i amb homologia per tres regions codificants, indicant la presència de tres exons en el gen *ciclina O*. La comparació d'aquestes ESTs amb el genoma humà també ha permès reconstruir el cDNA humà complet de la Ciclina O, capaç de codificar per un producte gènic amb elevada homologia per diferents membres de la família de les ciclins. Aquest cDNA humà ha facilitat la identificació del gen de la Ciclina O de ratolí i del seu cDNA a partir del seu genoma i les ESTs de ratolí existents. Ambdós cDNAs, humà i de ratolí, són idèntics en un 88% i els hipotètics productes gènics corresponents conserven un 73% d'identitat.

El disseny d'oligonucleòtids complementaris a l'inici i final de traducció del cDNA de la Ciclina O de ratolí han permès amplificar i clonar aquest cDNA a partir d'una llibreria provinent de timòcits apoptòtics de ratolí (4h postirradiació amb una dosi de 5Gy) mitjançant múltiples rondes d'amplificació per PCR. La seqüenciació d'aquest cDNA, anomenat α , (**Figura 5**) no mostra cap canvi respecte la seva reconstrucció

prèvia *in silico* a partir de la seqüència del genoma i de les ESTs disponibles, demostrant clarament la seva existència com a tal. Aquest, ha estat la base de la major part d'experiments descrits en aquest treball.

A partir de la seqüència traduïda del cDNA de la Ciclina O de ratolí s'ha comparat la seva homologia amb els membres de la família ciclina, evidenciant que es tracta d'una proteïna similar a les ciclins responsables de la progressió del cicle cel·lular, i lleugerament més semblant a les ciclins mitòtiques A1, A2 i B1 que a les ciclins de G1 (**Figura 2**).

Ciclina O vs			Ciclina A2 (422 AA) vs Ciclina O (352AA)	
Ciclina	% Identitat	% Similitud		
A1	32	49	MPGTSRHSGRDAGSALLSLHQEDQENNVNPEKLAPAQQPRAQAVLKAGNVR 50	-----MVTPCPASPGS-PAAGAGRRDSSHQN 24
A2	32	52	GPAPQQKLRTRVAPLKDLPINDEHVTAGPSWKAVSKQPAFTIHVDEAAE 100	*****
B1	32	51	LRAPVK--KSRRPCLRRKPLRPLNACSLPGDSGVCDLFESPPSSSDGAD 72	** * * * *
B2	29	48	TQKRPAELKETECEDALAFNAAVSLPAARKPLTPLDYPMDGSFESPHAM 150	
B3	26	50	S---PAVSAARDCS-----SLLNPAQPLTALD----- 96	** * * * *
C	/	/		
D1	30	48	MSIVLEDKPVNVNEVPDYQEDIHTYLREMEVKCKPKVGYMKRQPDITNSM 200	-----LQTFREYQSCYDFRKAQENLFHPRE-SLARQPQVTAES 134
D2	29	44		* * * * *
D3	30	42	RAILVDWLVEVGEEYKLNQETLHLAVNYIDRFLSSMSVLRGKQLVGTAA 250	RCKLLSWLLQVHRQFGLSFESLCLTVNTLDRFLLTTPVAADCFQLLGVT 184
E1	29	47		* * * * *
E2	29	47		* * * * *
F	23	42	MLLASKFEEIYPPEVAEFVYITDDTYSKKQVLRMEHLVVKVLAFLAAPT 300	LLIACKQVEVHPPRLKQLLALCGGAFSRQQLCNLECIVLHKLHFSLGAPT 234
G1	27	43		* * * * *
G2	27	41	VNQFLTQYFLHLQPAN-----CKVESLAMFLGELSLLIDADPYLYKPLS 343	INFFLEHFTQWRMEAGQAEVTEALEAQTLAGVAELSLTDYA-FTTYTFS 283
H	/	/		* * * * *
I	31	47	LIAGAAFHLALYTVTQSWPESLAQQTGYTLESCLKPCLVDLHQTYLKAQP 393	LMA--ICCLALADGLLQHHEMDLRLGEHPEATLQDCLGKQLTVLSIN-- 329
K	/	/		* * * * *
L1	/	/		
L2	/	/		
T1	/	/		
T2	/	/		
			HAQQSIREKYKHSKYHSVSLNPPETLSV 422	--SSSLPRILPPQIWERCSLPQSWQ---- 352
				* * * * *

Figura 2. Quantificació de la homologia de la seqüència peptídica de la Ciclina O de ratolí respecte els altres membres de la família i comparació de la seqüència completa de la Ciclina O amb la Ciclina A2. Per la comparació dels membres de la família ciclina amb la Ciclina O de ratolí s'ha utilitzat el programa *Blast 2 sequences* de l'NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Per la comparació de la seqüència completa de la Ciclina A2 vs la Ciclina O, ambdues de ratolí, s'ha utilitzat el programa ClustalW d'EMBL-EBI (www.ebi.ac.uk). Els asteriscs (*) indiquen la presència d'aminoàcids idèntics.

A la vegada, per homologia de seqüències a través de la seqüenciació del genoma o la presència de ESTs homòlogues, s'ha identificat l'existència de la Ciclina O en altres, espècies. Aquests resultats indiquen que la Ciclina O és present en mamífers (*Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Canis familiaris*, *Bos taurus*, *Sus scrofa*), amfibis (*Xenopus laevis*, *Xenopus tropicalis*) i peixos (*Fugu rubripes*, *Tetraodon nigrovidis*, *Danio rerio*), però no en plantes, insectes, nemàtodes o llevats. Així doncs, es podria tractar d'una ciclina específica de vertebrats (**Figura 3**).

A diferència del gen M87499, la seqüència del gen *ciclina O* manté la pauta de lectura i es correspon exactament amb el genoma humà i les diferents EST seqüenciades, coincidint algunes vegades amb el marc de lectura canviant del gen M87499. Així doncs, el nostre grup proposa el nou gen identificat al genoma humà com a veritable gen de la Ciclina O. Aquest, està format per uns extrems 5' i 3' no codificants d'extensió desconeguda, per dos introns de 597 i 496 parells de bases i per tres exons de 382, 186 i 480 parells de bases capaços de traduir una proteïna humana de 351 residus (352 residus en ratolí).

1.3 Identificació de diferents variants transcripcionals de la Ciclina O en ratolí

Seguint el mateix protocol que l'utilitzat en el clonatge del cDNA codificant per la Ciclina O de ratolí, anomenat cDNA α , també es va aïllar un cDNA, anomenat β , que difereix de l'anterior per la manca de la regió codificant del segon exó (**Figura 5**). Al mateix temps, al banc de dades de l'NCBI s'han descrit algunes ESTs (p.ex: CO805720, CO813161) amb homologia per la regió 5' no codificant i pel primer exó de la Ciclina O. Aquestes ESTs evidencien l'existència d'un segon promotor (P2) *upstream* del promotor de la Ciclina O (P1) i podrien correspondre a un transcrit incomplet, que hem anomenat γ , similar als cDNA α i β .

Tot i que són minoritàries i no s'han descrit en altres organismes, la identificació de les formes β i γ de ratolí suggereixen l'existència de variants de la Ciclina O amb una funció actualment desconeguda.

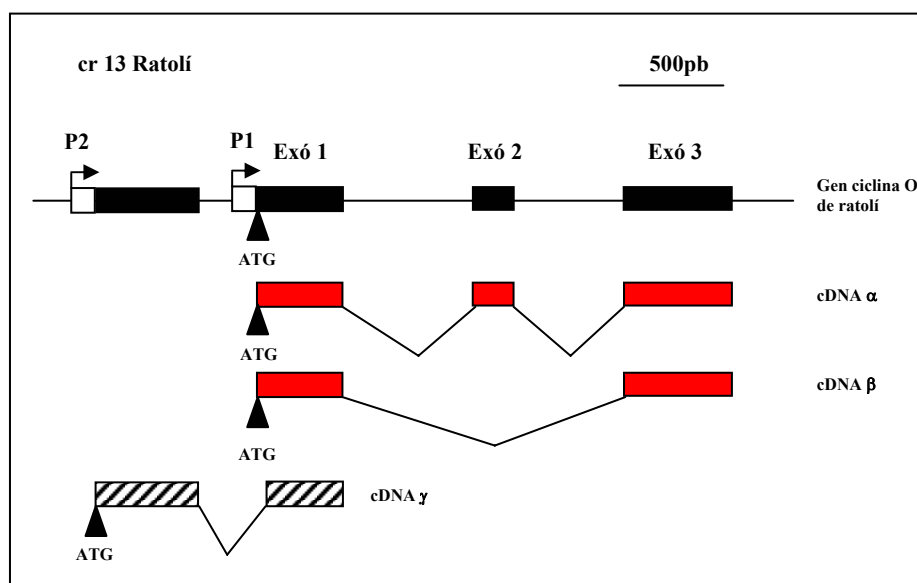


Figura 5. Variants transcripcionals identificades del gen de la Ciclina O de ratolí. Representació esquemàtica a escala de les variants cDNA α i β aïllades al laboratori, i de la variant γ disponible al banc d'ESTs de ratolí de l'NCBI. (Les caixes buides representen els promotors, les caixes negres representen els exons en el genoma de ratolí, les caixes vermelles representen exons amb un marc obert de lectura, i les caixes a ratlles representen seqüències transcrits sense un marc de lectura definit).

El gen M87499 fou identificat originalment a partir de la hibridació del genoma de fibroblasts amb un cDNA aïllat de cèl.lules T (Jurkat) capaç de codificar per la proteïna UDG *cyclin-like* (AAB05817) (260). La seqüència del gen M87499 i del corresponent

cDNA, anomenat cDNA δ , mostren mutacions respecte la seqüència del genoma humà, fet que corrobora la seva inexistència com a tals. Tanmateix, el clonatge d'aquest cDNA δ *per se* suggereix altra vegada l'existència de variants de la Cyclina O amb una funció desconeguda i reafirma el cDNA α com a transcrit majoritari i evolutivament més conservat, ja que aquesta és l'única forma que hem pogut trobar expressada en la resta de vertebrats analitzats.

1.4 Estudi del promotor de la Cyclina O

En humans, el primer exó de la Cyclina O està situat *upsteam* de la regió codificant descrita per M87499, però part del segon i el tercer exó coincideixen, ja que semblen procedir del mateix fenomen de *splicing* (Figura 4).

Mitjançant experiments de *primer extension* a partir d'una sonda propera a l'extrem 5' es va descriure l'origen de transcripció del gen M87499 a una posició 98nt *upstream* de l'origen de traducció (ATG), designat com a +1 (261) (Figura 6). Els estudis realitzats en aquest promotor poden ser aplicables a la regulació de la Cyclina O humana, ja que les regions promotores d'ambdós gens es solapen parcialment.

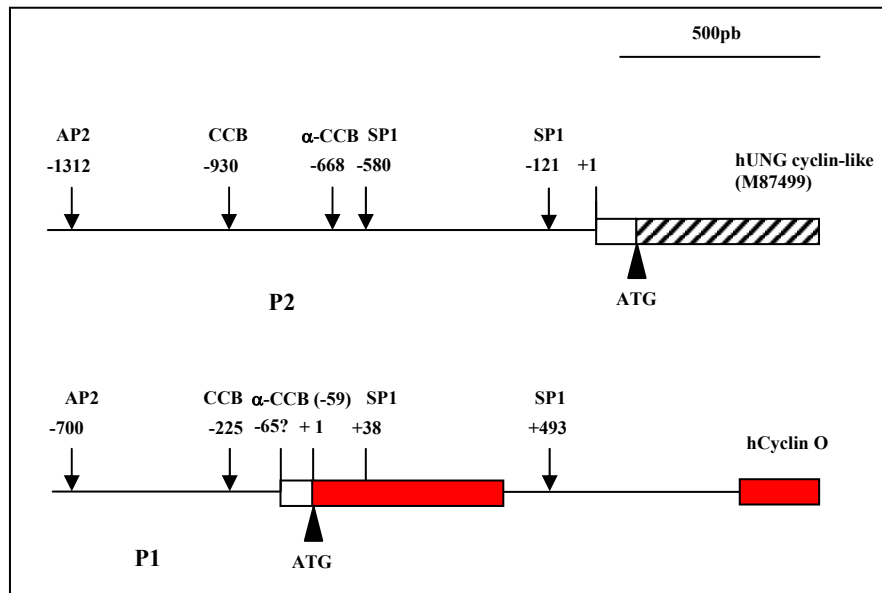


Figura 6. Comparació dels elements de la regió promotora del gen M87499 i de la Cyclina O en humans. Representació esquemàtica a escala dels elements reguladors de la transcripció identificats a la regió promotora del gen M87499 (P2) i conservats a la possible regió promotora de la Cyclina O (P1) situada al mateix locus cromosòmic (5p12.2-p13.1). Pel posicionar els elements reguladors cal tenir en compte que en el gen M87499 la posició +1 fa referència a l'inici de transcripció tal com s'ha descrit, mentre que en el gen humà de la Cyclina O la posició +1 fa referència a l'inici de traducció degut a que es desconeix actualment l'origen de transcripció. (Les caixes blanques representen la regió existent entre l'inici de transcripció i l'inici de traducció, les caixes vermelles representen exons amb un marc de lectura obert, mentre que les caixes a ratlles representen seqüències transcrites sense un marc de lectura definit).

Així doncs, el fet que el gen M87499 i el gen de la Cyclina O continguin una regió promotora solapada suggereix la participació d'elements de regulació comuns per al control d'ambdós gens.

Dins la regió promotora del gen M87499 s'han descrit diferents elements de control, entre els quals hi ha un element AP2 a la posició -1312, dos elements SP1 invertits (GC

boxes) a les posicions -580 i -121, un element CCB (*cell cycle box*) consens a la posició -930, i un element CCB invertit, anomenat α -CCB, a la posició -668 (261).

Actualment encara desconeixem l'inici de transcripció de la Cyclina O, però l'anàlisi de les ESTs existents en direcció 5' suggereix que l'inici de transcripció podria estar a prop de la posició -65 en relació a l'inici de traducció (posició +1) (**Figura 6**). Segons aquestes dades, alguns dels elements descrits en la regió promotora del gen M87499 tals com el motiu AP2, la caixa CCB i possiblement la caixa α -CCB (situada a la posició -59 i per tant, a 3' de l'inici de transcripció) és probable que també intervinguin en la regulació transcripcional de la Cyclina O. La comparació de la regió promotora descrita per M87499 amb la seqüència del genoma humà és idèntica pel que fa a la presència d'aquests motius, descartant possibles divergències com les observades entre la regió codificant de M87499 i el genoma humà.

2 Discussió

2.1 cDNA β i γ

L'expressió del cDNA β , en la mateixa fase de lectura que la seqüència del primer i tercer exó del cDNA α , està regulada pel mateix promotor que la Ciclina O (promotor P1) i codifica per una proteïna similar, tot i que de tamany inferior (290 residus). Estudis previs al laboratori indiquen que la sobreexpressió d'aquesta proteïna en cèl·lules HEK293, tot i ser reconeguda per l'anticòs policlonal generat contra la Ciclina O, és incapaç d'interaccionar amb Cdk2 i fosforilar la Histona H1 (resultat no mostrat). La manca del segon exó i per tant, de part de la seqüència *cyclin box* responsable de la interacció amb proteïnes cdk, podria ser la causa de la pèrdua d'activitat kinasa associada d'aquesta variant de *splicing* de la Ciclina O.

Les poques ESTs de ratolí disponibles corresponents a l'expressió del transcrit anomenat cDNA γ són idèntiques a la regió 5' no codificant i a part del primer exó de la Ciclina O. A diferència del cDNA β , el cDNA γ està regulat per un promotor alternatiu (P2), però no manté un marc de lectura obert que sigui capaç de generar un producte gènic funcional. La poca i recent informació existent sobre aquestes ESTs ens ha portat a l'estudi de l'extensió completa d'aquest cDNA i de la seva possible funcionalitat en la producció d'una proteïna similar a la Ciclina O. Malgrat això, hem pogut comprovar la seva expressió en diferents teixits (resultat no mostrat).

En conclusió, els dos transcrits de ratolí (cDNA β i cDNA γ) similars al transcrit cDNA α codificant per la Ciclina O, semblen ser formes evolutivament menys conservades i inactives (en el cas del cDNA β) o traduccionalment no productives (en el cas del cDNA γ). Malgrat no tenir un paper funcional similar a la Ciclina O, aquests cDNAs de seqüència parcialment homòloga podrien intervenir en la regulació transcripcional de la Ciclina O en ratolí alterant la seva expressió. En aquest sentit, actualment estem estudiant el patró d'expressió d'ambdós transcrits respecte l'expressió del cDNA α en els teixits de ratolí i en diferents condicions d'apoptosi.

2.2 cDNA δ

2.2.1 Enzims UDG / UNG i reparació del DNA

Els organismes procariotes i eucariotes han desenvolupat mecanismes que inhibeixen la divisió cel·lular en cas de detectar dany al DNA. Així, quan les cèl·lules s'exposen a agents lesius com la radiació ionitzant o altres, hi ha un retard en la progressió del cicle cel·lular i en molts casos una aturada que la cèl·lula aprofita per reparar el DNA abans de la següent generació de cèl·lules filles.

Al mateix temps, els organismes procariotes i eucariotes han desenvolupat i perfeccionat mecanismes de reparació del DNA. Un dels mecanismes de reparació generals es basa en la reparació per escisió de la base nitrogenada (BER, base excision repair) en el qual una base nitrogenada danyada o inapropiada és substituïda pel nucleòtid correcte (287). En aquest procés hi intervenen DNA glicosilases específiques en l'eliminació de bases atípiques com són l'uracil, l'hipoxantina i la 3-metiladenina. Així, els enzims amb activitat uracil DNA-glicosilasa (UDG o UNG) s'han especialitzat en la hidròlisi de l'enllaç N-glicosil d'un uracil incorporat al DNA generant una base

lliure. El lloc apirimidínic generat serà tallat posteriorment per una activitat endonucleasa específica i reomplert per la DNA polimerasa β .

El gen *ung*, situat al locus 12q23-q24.1, codifica per una forma mitocondrial (coneguda com a UDG1 o UNG1) i una forma nuclear de l'enzim (coneguda com a UDG1A o UNG2) utilitzant diferents promotors i un processament de *splicing* alternatiu (135,277). A part d'aquestes dues isoformes majoritàries també s'han descrit altres uracil-DNA glicosilases com: la timina (uracil)-DNA glicosilasa (TDG) mostrant una forta preferència per T o U complementàries a la G (273), una uracil-DNA glicosilasa *cyclin-like* (M87499) (260) i una uracil-DNA glicosilasa (SMUG1) (137) que prefereix l'U en monocadenes de DNA com a substrat. Malgrat la identificació d'aquestes formes enzimàtiques, encara no s'ha determinat si les diferents uracil-DNA glicosilases tenen funcions diferents o estan parcialment o totalment solapades.

2.2.2 Clonatge de la UDG *cyclin-like*

Per identificar la proteïna responsable de l'activitat UDG de cèl.lules HeLa es va procedir a la inoculació d'extractes purificats de cèl.lules HeLa amb activitat UDG en conill i s'obtingueren anticossos policlonals amb capacitat per identificar una banda de 35kDa del mateix extracte (260). Mitjançant un sistema de traducció *in vitro* s'utilitzà aquest anticòs per identificar els productes d'una llibreria de cDNA de cèl.lules T (Jurkat). L'anticòs identificà com a positiu una proteïna de 35kDa (AAB05817) provinent d'un cDNA d'1,25Kb (que nosaltres hem anomenat cDNA δ). Curiosament, aquesta proteïna no manté cap homologia amb altres enzims uracil-DNA glicosilasa humans ni amb les glicosilases de llevat, *E coli* o del virus de l'herpes simplex, i la sobreexpressió del producte del cDNA no confereix més activitat UDG a les cèl.lules de mamífer (261). En canvi, la comparació d'aquesta seqüència a la base de dades de proteïnes de l'NCBI mostra certa homologia amb els membres de la família de les ciclins, motiu pel qual fou batejada inicialment com a UDG *cyclin-like* (262) i posteriorment com a Ciclina O (268).

Així doncs, l'anticòs generat reconeix com a positiu un clon de cDNA capaç de generar una proteïna amb homologia per les ciclins (AAB05817), però diferent de l'objectiu inicial d'aquest estudi (260), ja que no mostra cap tipus d'activitat UDG. Per explicar aquest fet existeix la possibilitat que la inoculació de l'extracte cel.lular purificat amb activitat UDG en conill hagi generat anticossos contra altres proteïnes presents en l'extracte, possiblement associades a la pròpia proteïna UDG o a la seva activitat, sense necessitat de ser-ne les principals responsables.

Posteriorment, per tal d'identificar el gen humà de la UDG *cyclin-like* s'hibridà el cDNA d'1,25Kb (cDNA δ) amb una llibreria genòmica de fibroblasts de pulmó humà (261). Mitjançant tècniques de *Southern* i seqüenciació dels clons positius es va conèixer la seqüència completa del gen de la UDG *cyclin-like* i es diposità a la base de dades de l'NCBI (M87499). Per hibridació somàtica d'aquest cDNA s'establí la posició del gen al cromosoma 5 humà.

La observació en el nostre laboratori que el gen M87499, teòricament capaç de generar la proteïna UDG *cyclin-like*, no correspon exactament a la seqüència del genoma humà suggereix que el cDNA d'1,25Kb (cDNA δ) clonat originalment a partir d'una llibreria de cèl.lules T també conté mutacions que resulten en la producció d'una proteïna errònia amb certa homologia a les ciclins (AAB05817).

2.2.3 Identificació d'un mecanisme repressor del gen M87499 (UDG *cyclin-like*) possiblement conservat en el gen de la Ciclina O

L'origen del cDNA d'1,25Kb (cDNA δ) a partir d'un promotor *downstream* (P2) respecte el promotor de la Ciclina O (P1) indica la presència de dos transcrits en el mateix locus humà amb un solapament parcial dels dos promotors.

La regió codificant d'aquets dos gens difereix en la regió 5', ja que la Ciclina O conté un primer exó totalment inexistent en el gen M87499, però comparteixen parcialment el segon i totalment el tercer exó (**Figura 4**). El solapament de la regió promotora indica que hi ha certs elements comuns que podrien intervenir en la regulació d'ambdós gens (**Figura 6**). De forma similar al transcrit cDNA γ en ratolí, l'existència de promotors alternatius i de transcrits parcialment homòlegs al cDNA α podria implicar un mecanisme de regulació dels nivells d'expressió de la Ciclina O addicional.

Els experiments d'expressió gènica en cèl.lules NIH3T3 i HeLa transfectades mostren com la regió d'1,4Kb *upstream* de la regió codificant del gen M87499 pot funcionar com a promotor autònom (261). Aquesta regió conté un element AP2 consens conegut per activar la transcripció en resposta als ésters de forbol i al cAMP, i dos elements SP1 invertits (GC boxes) responsables de l'expressió basal d'alguns gens.

Tot i que aquest promotor humà no té similitud amb els promotors dels gens de les ciclines de llevat CLN1 i CLN2, també presenta un motiu consens anomenat *cell cycle box* (CCB) i un motiu CCB invertit (anomenat α -CCB) característics d'aquestes ciclines. El motiu CCB (C_CGAAA) en els gens de llevat actua regulant l'expressió de gens específics de G1 a través de la unió amb els factors de transcripció SWI4 i SWI6 (283). Curiosament, aquestes seqüències consens de llevat són similars als elements de reconeixement d'E2F en mamífers, però la seva deleció en el promotor del gen M87499 no mostra cap augment de l'activitat transcripcional (261).

L'estudi de la regió promotora de M87499 a l'hora de dirigir l'activitat transcripcional de l'enzim CAT identificà una regió de 209pb (que conté l'element α -CCB) amb una gran capacitat inhibidora de la transcripció (261). La regió *upstream* i *downstream* d'aquest fragment, (on estan situats els altres elements descrits), són lleugerament activadores i responsables de la transcripció basal.

Utilitzant aquest fragment de 209pb marcat radioactivament s'han realitzat assajos de *gel-shift* i s'ha identificat la presència de diferents complexos units al promotor del gen M87499 en funció del cicle cel.lular. Així, mentre que a l'inici de la fase G1 no sembla haver-hi cap complex format, a meitat de la fase G1 hi ha un canvi de mobilitat atribuïble a la formació d'un complex DNA-proteïna (261). Aquest complex és transitori i no s'observa a finals de la fase G1 ni durant la fase S. Per contra, a la fase S apareixen dues noves bandes de menor mobilitat electroforètica, i quan la cèl.lula entra a la fase G2 incrementa la intensitat d'aquests dos complexos a la vegada que apareixen tres noves bandes de tamany inferior.

Per determinar la presència de la proteïna α -CCB en aquests cinc complexos observats durant la fase G2 els mateixos experiments s'han fet afegint un oligonucleòtid no marcat radioactivament corresponent a l'element d'unió a α -CCB. En aquestes condicions competitives els tres complexos de baix pes molecular desapareixen, indicant la presència de α -CCB i la seva funció com a factor repressor de la transcripció (261).

Objectius:

**2-Estudi bioquímic
de l'activador apoptòtic de Cdk2**

**3-Estudi dels efectes cel.lulars
de l'activador apoptòtic de Cdk2
en condicions de sobreexpressió**

Capítol 2. Efectes de la Ciclina O en el cicle cel.lular i l'apoptosi

1 Resultats

1.1 Formació i activació del complex Cdk2-Ciclina O *in vitro*

Per començar, després de la identificació *in silico* i el clonatge de la Ciclina O cal comprovar si aquesta nova ciclina manté els trets característics de l'activador de Cdk2 en apoptosi, la interacció i l'activació de Cdk2.

Partint d'una llibreria de cDNA provinent de timòcits apoptòtics de ratolí i d'oligonucleòtids homòlegs a l'extrem 5' i 3' es va aïllar la seqüència del cDNA de la Ciclina O de ratolí mitjançant l'amplificació per PCR. El cDNA de la Ciclina O seqüenciat es va clonar dins el vector pGEX3X per tal d'expressar la proteïna recombinant GST-Ciclina O en un sistema bacterià. La proteïna de fusió GST-Ciclina O es va unir a boles de glutatió-sefarosa facilitant la seva purificació a partir de l'extracte bacterià i seguidament es va incubar dins un lisat total de cèl.lules HEK293 per tal de permetre la formació de complexos amb proteïnes cdk que posteriorment van ser analitzats mitjançant *western blotting* i assajos kinasa. Utilitzant la mateixa quantitat de proteïna recombinant i de lisat cel.lular aquests experiments també es van realitzar amb les proteïnes GST-Ciclina A2, GST-Ciclina D2, GST-Ciclina D3, GST-Ciclina G1, GST-Ciclina I i GST-GFP com a control negatiu (**Figura 1**). El resultat d'aquests experiments *in vitro* demostren com la proteïna GST-Ciclina O interacciona amb Cdk2 formant un complex actiu capaç de fosforilar la Histona H1, mentre que la proteïna GST-GFP que no té homologia amb la família de les ciclins, com és d'esperar no forma cap complex amb activitat kinasa. Aquest control negatiu també es va utilitzar per determinar la presència d'interaccions inespecífiques amb GST, o amb les boles de glutatió-sefarosa, de proteïnes que podrien donar lloc a falços positius. Com a control positiu es va utilitzar la proteïna GST-Ciclina A2, mostrant una forta interacció i activació de la kinasa Cdk2. En l'autoradiografia l'assaig de l'activitat kinasa associada a les proteïnes GST-Ciclina A2 i GST-Ciclina O també s'observa la presència d'una banda d'elevat pes molecular que es correspon amb el pes de la pròpia proteïna de fusió GST-ciclina. En aquest cas els complexos actius fosforilen les pròpies ciclins (reaccions d'autofosforilació), i en alguns casos aquesta reacció sembla ser la responsable de l'inici dels processos de degradació (veure **Capítol 3, apartat 1C 1.7**).

Per tal de comparar els complexos de la proteïna GST-Ciclina O amb altres candidats a regular l'activitat apoptòtica de Cdk2 també s'ha testat l'activitat dels complexos formats per GST-Ciclina D2, GST-Ciclina D3, GST-Ciclina G1 i GST-Ciclina I. Exceptuant la proteïna GST-Ciclina D2, la interacció d'aquestes ciclins amb Cdk2 és molt dèbil, i en tots aquests casos l'activitat kinasa sobre la Histona H1 és pràcticament inexistent.

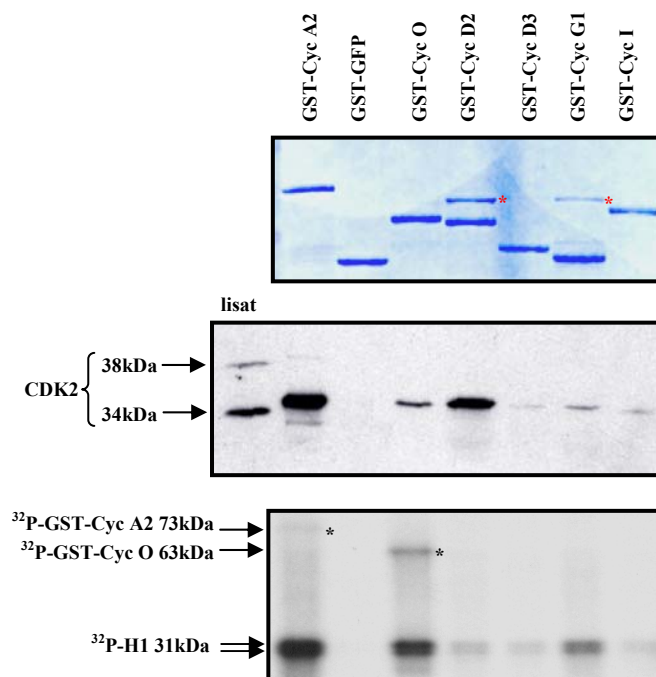


Figura 1. Pull Down i assaig kinasa dels complexos cdk-Ciclina O. La imatge superior mostra una tinció per Coomassie de les proteïnes de fusió utilitzades en el *pull down* i en l'assaig kinasa. (l'asterisc vermell *, indica la presència de proteïnes unides inespecíficament). El *western blot* intermedi mostra la quantitat de Cdk2 capaç d'interaccionar amb cadascuna de les proteïnes de fusió després de ser incubades en un lisat total de cèl.lules HEK293. L'autoradiografia inferior mostra l'activitat kinasa dels complexos cdk-ciclina resultants de la incubació anterior. (l'asterisc negre *, mostra les reaccions d'autofosforilació).

Per tal de confirmar la interacció Ciclina O-Cdk2, enlloc de purificar la proteïna GST-Ciclina O i determinar la presència de la interacció amb Cdk2 s'ha optat per fer el procediment contari. En aquest cas, la proteïna GST-Ciclina O purificada s'ha afegit dins un lisat total de cèl.lules HEK293 i posteriorment, s'ha immunoprecipitat la proteïna Cdk2. Per determinar l'activitat kinasa dels complexos formats, després d'immunoprecipitar Cdk2 s'ha realitzat un assaig kinasa utilitzant com a substrat la Histona H1, mentre que per determinar la presència de la Ciclina O s'ha resolt tot mitjançant una electroforesi desnaturalitzant. En la tinció de les proteïnes per Coomassie s'observa la presència de la proteïna GST-Ciclina O, evidenciant la co-immunoprecipitació amb Cdk2. A diferència de GST-Ciclina O, la proteïna Cdk2 immunoprecipitada no és detecta en la tinció per Coomassie, segurament degut al pes similar de la Histona H1 afegida en l'assaig kinasa i que en dificulta la seva identificació. La presència abundant de les bandes de la cadena pesada de les immunoglobulines (IgG) indica la quantitat del sèrum de conill immunitzat contra Cdk2 utilitzat en l'immunoprecipitat (**Figura 2 A**). El resultat de l'assaig kinasa s'observa en l'autoradiografia d'aquest gel, on es pot observar la transferència de fosfats radioactius dels complexos immunoprecipitats amb Cdk2 sobre la Histona H1 i sobre la pròpia GST-Ciclina O, confirmant l'existència del complex GST-Ciclina O-Cdk2 i la reacció d'autofosforilació degut a l'activitat kinasa de Cdk2.

Com a control negatiu el mateix tipus d'experiment s'ha realitzat amb la proteïna GST. En aquest, Cdk2 no co-immunoprecipita amb GST, descartant la possibilitat d'una interacció inespecífica, i tampoc s'observa cap reacció d'autofosforilació. En aquest

control, la fosforilació sobre la Histona H1 representa l'activitat de tots els complexos formats per Cdk2 amb d'altres ciclines, mentre que en la incubació de GST-Ciclina O s'ha enriquit la formació del complex Ciclina O-Cdk2. Com s'ha vist anteriorment (**Figura 1**), l'activitat específica del complex GST-Ciclina O-Cdk2 sobre la Histona H1 sembla ser menor que l'activitat d'altres complexos, com per exemple: Ciclina A2-Cdk2.

Utilitzant les mateixes condicions que en l'experiment d'immunoprecipitació s'ha comparat l'eficiència de recuperació dels complexos GST-Ciclina O-Cdk2 mitjançant un *pull down* com el descrit en la **Figura 1**. Tot i que els resultats són comparables, la unió a les boles de glutatió-sefarosa permet una recuperació més eficient dels complexos formats amb GST-Ciclina O (**Figura 2 B**). En aquest cas s'observa que el control negatiu amb la proteïna GST no comporta una activitat kinasa significativa, mentre que l'efectiva recuperació dels complexos formats amb GST-Ciclina O mostren una activitat kinasa elevada sobre ells mateixos i sobre la Histona H1.

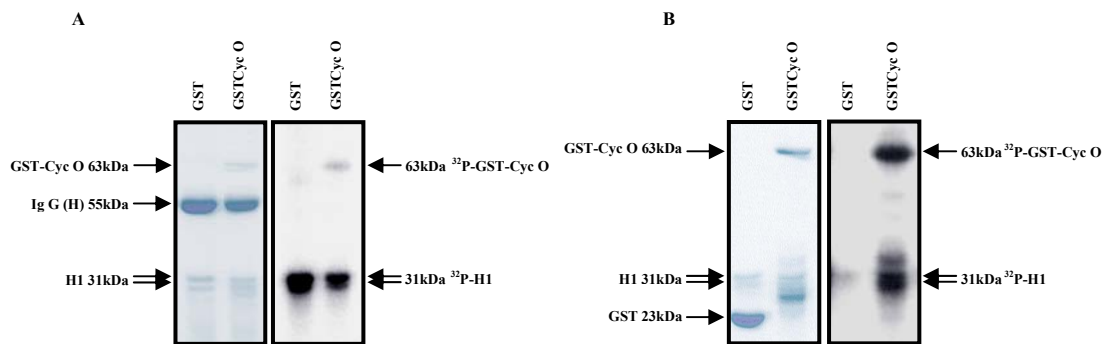


Figura 2. Formació del complex Cdk2-Ciclina O actiu. Tinció de Coomassie on es mostren les bandes electroforètiques resultants de la immunoprecipitació de Cdk2 d'un lisat de cèl.lules HEK293 en presència de GST o GST-Cyc O. A la dreta es mostra l'autoradiografia del mateix gel on es detecta l'activitat kinasa dels complexos formats amb Cdk2 (A). Tinció per Coomassie on es veuen les bandes electroforètiques resultants d'un assaig de *pull down* amb les proteïnes GST o GST-CycO incubades amb un lisat de cèl.lules HEK293. A la dreta es mostra l'autoradiografia del mateix gel on es detecta l'activitat kinasa associada a GST-Cyc O (B).

En els anteriors experiments s'ha evidenciat la formació del complex actiu GST-Ciclina O-Cdk2, però no es pot descartar la formació d'altres complexos entre la Ciclina O i les proteïnes kinasa presents en els lisats cel.lulars. Mentre en els immunoprecipitats de Cdk2 en presència de GST-Ciclina O una part de l'activitat kinasa detectada pot provenir dels complexos amb Cdk2 actius durant el cicle cel.lular, en els experiments de *pull down* (**Figures 1 i 2 B**) la formació de complexos entre la Ciclina O i altres proteïnes cdk podrien ser responsables de gran part de l'activitat kinasa detectada. Per comprovar l'existència d'aquests possibles complexos i determinar l'especificitat de la Ciclina O s'han utilitzat lisats de cervell de ratolí, on les quantitats de Cdk1 i Cdk2 són indetectables per *western blotting*. Com a control positiu s'han utilitzat lisats provinents de melsa de ratolí, amb abundants quantitats d'aquestes dues kinases (**Figura 3 A**). Mitjançant experiments de *pull down*, incubant la proteïna GST-Ciclina O amb aquests lisats, s'ha observat que en ambdós teixits hi ha les condicions necessàries per formar complexos actius amb GST-Ciclina O capaços d'autofosforilar-se i fosforilar la Histona H1 (**Figura 3 B**). Aquests resultats evidencien l'existència d'altres kinases, diferents de Cdk1 i Cdk2, amb capacitat per formar complexos actius amb la Ciclina O. Com a

control negatiu, la proteïna GST incubada en ambdós teixits és recuperada en el *pull down* sense mostrar cap tipus d'activitat kinasa associada.

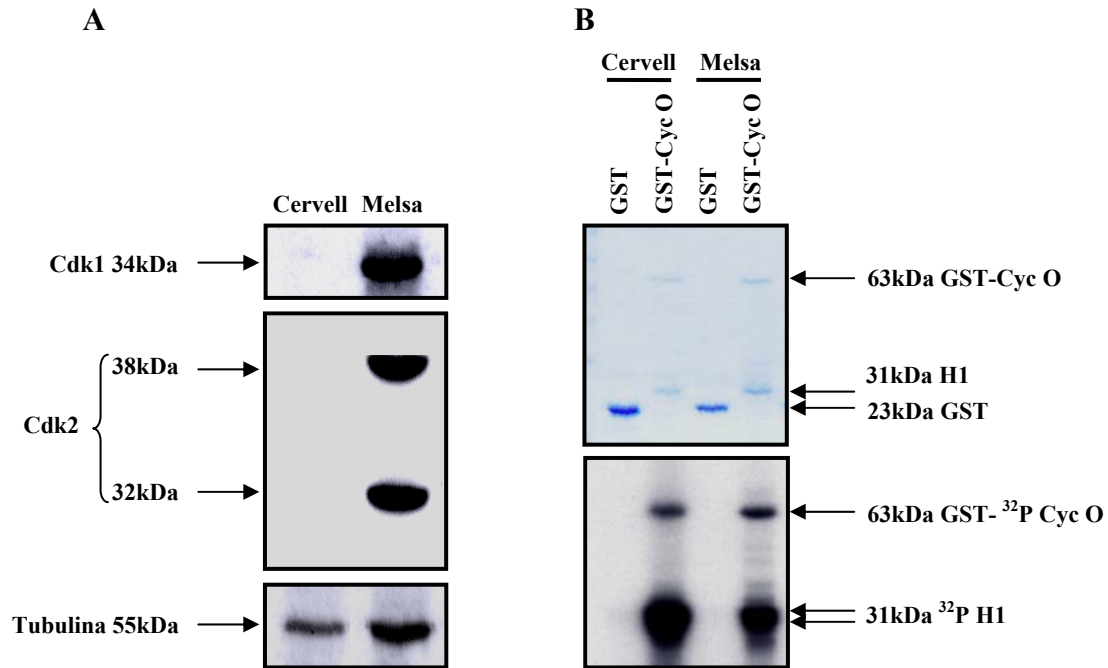


Figura 3. Formació de complexos cdk-Ciclina O en absència de Cdk2. Detecció per *western blotting* de Cdk1 i Cdk2 en un lisat total de cervell i melsa (A). *Pull down* i activitat kinasa associada a la Ciclina O en un lisat total de cervell i melsa (B).

La roscovitina és un inhibidor potent i reversible de la kinasa Cdk2 ($IC_{50} = 0,65\mu M$), encara que a dosis més elevades també és capaç d'inhibir l'activitat de i Cdk1, Cdk5, Cdk7 i Cdk9 competint per la unió amb l'ATP. L'addició de roscovitina a un cultiu cel.lular proliferant pot arrestar les cèl.lules en totes les fases del cicle cel.lular, i aquestes acaben morint.

Tot i que l'experiment anterior planteja l'existència de múltiples complexos cdk-Ciclina O, possiblement de manera dependent del teixit, per determinar amb quina cdk s'uneix preferentment la Ciclina O en cèl.lules HEK293 s'ha titulat l'activitat kinasa d'aquests complexos a diferents concentracions de roscovitina. A partir de lisats de cèl.lules HEK293 que expressen constitutivament la proteïna HA-Ciclina O s'ha immunoprecipitat aquesta proteïna amb l'anticòs anti-HA i s'ha mesurat la seva activitat kinasa associada en presència de concentracions creixents de l'inhibidor roscovitina (**Figura 4**). En les mateixes condicions s'han realitzat immunoprecipitacions amb l'anticòs anti-Cdk1 i anti-Cdk2 per tal de comparar la cinètica d'inhibició dels complexos amb HA-Ciclina O respecte els complexos amb aquestes dues kinases.

L'activitat kinasa dels complexos amb Cdk1 no es veu afectada per la presència de $0,65\mu M$ de roscovitina. En canvi, de forma similar a l'activitat de Cdk2, l'activitat kinasa associada a la proteïna HA-Ciclina O s'inhibeix significativament a una concentració de $0,65\mu M$ de roscovitina, suggerint que la major part dels complexos formats són Ciclina O-Cdk2.

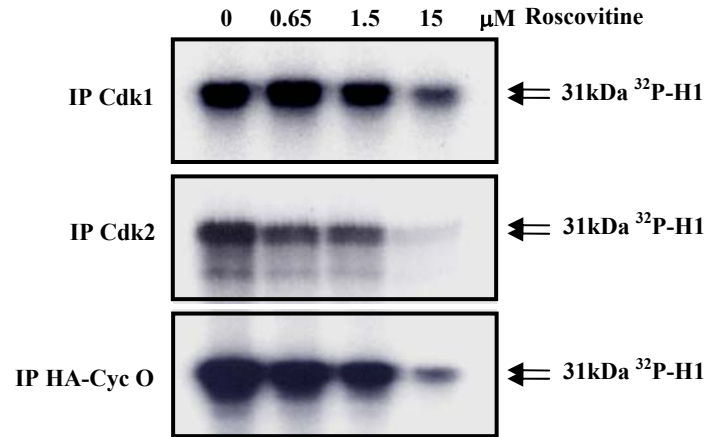


Figura 4. Inhibició dels complexos cdk-Ciclina O amb roscovitina. Immunoprecipitació i assaig de l'activitat kinasa de Cdk1, de Cdk2 i HA-Cyc O en presència de diferents concentracions de roscovitina. (experiment realitzat amb el clon E10 de cèl.lules HEK293, positiu per l'expressió constitutiva de HA-Ciclina O)

1.2 Localització nuclear i citoplasmàtica de la Ciclina O

Per determinar la localització cel.lular de la Ciclina O s'han realitzat transfeccions transitòries on es sobreexpressa la proteïna de fusió GFP-Ciclina O en cèl.lules HEK293 (**Figura 5 A**). Com a control negatiu, s'han realitzat transfeccions en les mateixes condicions per tal de sobreexpressar només la proteïna GFP (green fluorescence protein). Aquesta proteïna verda fluorescent és d'un tamany prou petit per difondre entre el nucli i el citoplasma, de manera que les acumulacions i la distribució de la proteïna de fusió GFP-Ciclina O en algun dels compartiments cel.lulars es considerarà un efecte específic de la Ciclina O. Per tal d'identificar la regió nuclear les cèl.lules han estat tractades amb l'agent intercalant del DNA, iodur de propidi. Aquesta mol.lècula es situa entre les dobles cadenes del DNA emetent fluorescència vermella que permetrà identificar la cromatina interfàsica, o en el seu cas els cromosomes metafàsics, mitjançant l'ús del microscòpi de fluorescència. La superposició de la fluorescència vermella i verda ens indica que d'igual manera que la GFP, la proteïna GFP-Ciclina O es pot localitzar al nucli i al citoplasma, tot i que algunes cèl.lules només presenten una tinció nuclear (resultat no mostrat).

Mitjançant tècniques d'immunocitoquímica i l'anticòs anti-Ciclina O també s'ha determinat la localització de la proteïna HA-Ciclina O expressada constitutivament en clons de cèl.lules HEK293. En aquest cas els resultats han estat molt similars, mostrant una tinció nuclear i citoplasmàtica de la ciclina. Com a control negatiu el mateix protocol s'ha seguit en el cas d'un clon cel.lular negatiu per l'expressió de la proteïna HA-Ciclina O, mostrant l'absència d'una tinció inespecífica (**Figura 5 B**).

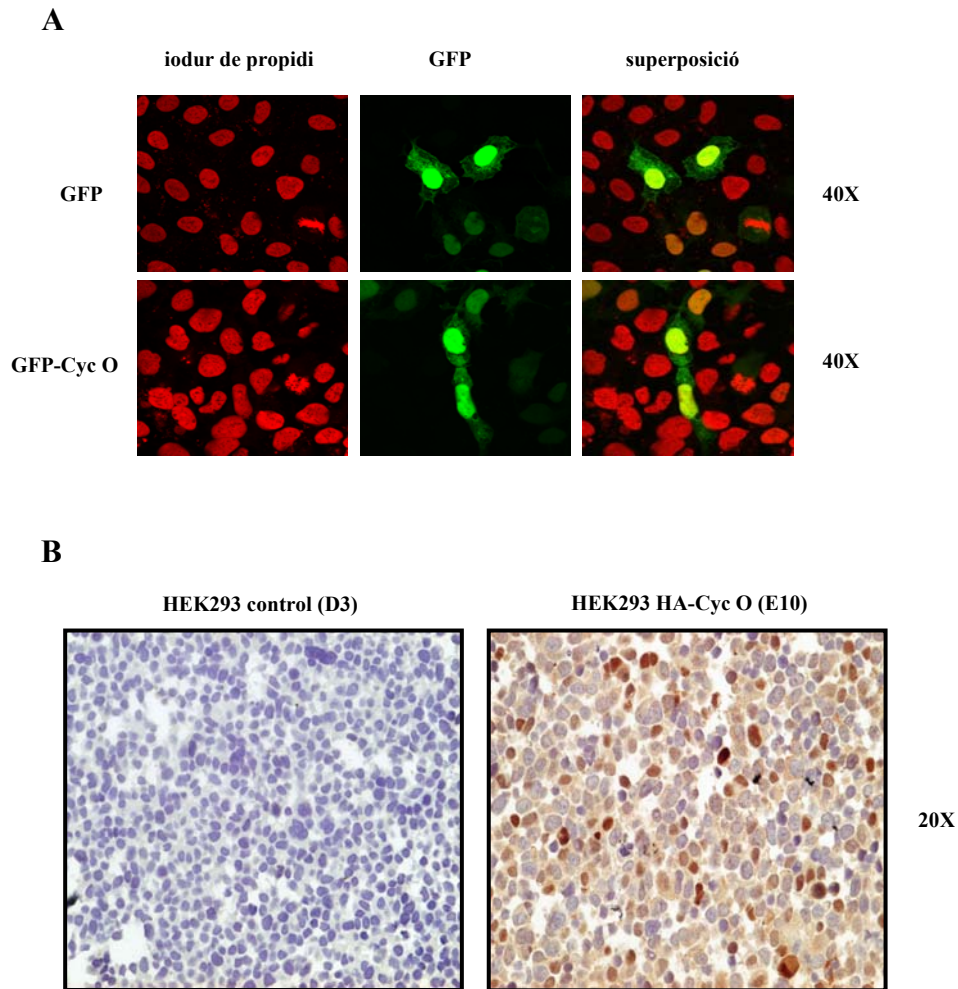


Figura 5. Localització nuclear i citoplasmàtica de la Ciclina O. Localització per microscopia de fluorescència de la proteïna verda GFP o la proteïna de fusió GFP-Cyc O en cèl.lules HEK293 24h després de ser transfectades. Per identificar la regió nuclear s'ha tenyit el DNA amb el colorant fluorescent vermell iodur de propidi (A). Tinció amb hematoxilina i localització de la Cyc O per immunohistoquímica, utilitzant l'anticòs anti-Ciclina O, en un clon control de cèl.lules HEK293 o un clon que expressa la Ciclina O de manera constitutiva (B).

Confirmant els resultats anteriors, l'anàlisi de la seqüència peptídica de la Ciclina O en diferents espècies mostra l'existència d'un motiu [KKSRR] altament conservat i proper a l'extrem N-ter que podria actuar com a NLS (Nuclear Localization Sequence) (**Figura 6**). A la vegada, els aminoàcids localitzats entre les posicions 89-98 de la Ciclina O de ratolí descriuen la seqüència PAQPLTALDL parcialment conservada en altres organismes. Aquesta seqüència és molt similar al motiu NES (Nuclear Export Sequence) [LX₍₁₋₃₎LX₍₂₋₃₎LXL], on L representa un residu hidrofòbic i X un aminoàcid qualsevol (**Figura 7**). Ambdós elements, podrien ser responsables de la localització nuclear i/o citoplasmàtica d'aquesta proteïna en funció de les diferents situacions cel.lulars.

X.laevis	MVTCMRCTEEHLLGAPAAFSSGKRKRDSGYS PGDATPGDRGEGGPDWPSAGIKKRVKYS	60
X.tropicalis	MVTCMRCTEERLLGAP--LDSGKRKRDS-VSPGDATPGDRGEG-----TKRAKYS	48
M. musculus	MVTPCP-----ASPGSPAAGARRDSHQNLRAPVKKSRRC-----LRRKKP	42
R. norvegicus	MVTPCP-----ASPASPASGAGRQDNHQNLRAPVKKSRRC-----LRRKEP	42
H. sapiens	MVTPCP-----TSPSSPAARAGRNDQNLRAPVKKSRRC-----LRRKQP	42
P. troglodytes	MVAPCP-----TSPSSPAARAGRNDQNLRAPVKKSRRC-----LRRKQP	42
C. familiaris	MVTPCP-----SSLVSPAARAGKRNDQNLRAPVKKSRRC-----LRRKQP	42
Bos taurus	-----MSPAAWAARQD-ARNLRAPVKKSRRC-----LRRKQP	32
Sus scrofa	-----PGEESRRRC-----LRRKQP	15
Fugu rubripes	MVAPAE-----GGCGSGTLHRRTPTTAAPPD-----RQKA	32
T. nigrovidis	MVAPGG-----SDCGSGTVHKKRKRGTAAAVSDAHTPA-----RPRQNA	39
Danio rerio	-----	

Figura 6. Comparació interespecífica de la seqüència de la Ciclina O on s'indica un motiu [KKSRR] com a possible NLS (Nuclear Localization Sequence) responsable de la seva localització nuclear.

X.laevis	RHRKQRLLELRSCDSGVADLYETPSPSPVAPTPTNEPYDSPCTSM-----DRLGLOSFS	114
X.tropicalis	RHRKQRLLELRSCDSGVADLYETPSPSPVAPCPTYEPWDT-CPPMS-----DRLGLOSFR	101
M. musculus	LRPLNACSLP-GDSGVCDLFESPSSSSDGADSPAVSAARDCSLLNPAQPLTALDLOTFR	101
R. norvegicus	LRPLNACSLP-GDSGVCDLFESPSSSSDGADSPAVSAVRDCSSLLSSAQPLTALDLOTFR	101
H. sapiens	LHPLNCPCLP-GDSGICDLFESPSSSGDGAESP--SAARGGSLPGPAQPVAQLDLOTFR	99
P. Troglodytes	LHPLNCPCLP-GDSGICDLFESPSSSGDGAESP--SAARGGSLPGPAQPVAQLDLOTFR	99
C. familiaris	LQPLQPCPLP-GDSGVCDLFESPSSSGDGAESPAASAALGCSPLPPPAQEAVQLDLOTFR	101
Bos taurus	LQPLNISPLP-GDSGVCDLFESPSSSGDGTDSP---AARDCSVPVGAQAQLDLOTFR	88
Sus scrofa	LQALNPCLLP-GDSGVCDLFESPSSSGDAADSPAPSTAPRCNSLPGPAQQLVQLDLOTFR	74
Fugu rubripes	RRRKQKFMKSKLSDSGFEEDL-APSPSPSPVRIEVLPLRPHAGQLP-----TWFL	80
T. nigrovidis	RCRKQTLMSRLSDSGYEEDL-SPSPSPSPVQMEVFAPRPHAGQLS-----HWYL	87
Danio rerio	-----	

Figura 7. Comparació interespecífica de la seqüència de la Ciclina O on s'indica un motiu [LX₍₁₋₃₎LX₍₂₋₃₎LXL] com a possible NES (Nuclear Export Sequence) responsable de la seva localització citoplasmàtica.

1.3 Inducció de l'apoptosi per sobreexpressió de la Ciclina O

Mentre que els clons cel.lulars que expressen nivells baixos i constitutius de la Ciclina O són viables, en els experiments de sobreexpressió a partir de transfeccions transitòries s'observen una nivells elevats de la Ciclina O (resultat no mostrat) i uns efectes cel.lulars letals a temps llargs. Aquests efectes es fan evidents a partir de les 48h d'expressió de la Ciclina O, observant un increment en el desprendiment de les cèl.lules adherides a la placa de cultiu en comparació amb les transfeccions control o amb les cèl.lules sense transfectar (**Figura 8 A**).

Tot i que aquests efectes són visualment més impactants en les transfeccions amb pEGFP-Ciclina O, per evitar possibles interferències de la proteïna GFP en l'estabilitat de Ciclina O, o sobre la seva funcionalitat, s'han quantificat les cèl.lules flotants a partir de les transfeccions amb el vector pcDNA-HA-Ciclina O (**Figura 8 B**). En aquest cas, la sobreexpressió d'HA-Ciclina O comporta un increment de més de 8 vegades en el nombre de cèl.lules flotants respecte la transfecció control. Tanmateix, no hi ha diferències significatives en la quantificació de les cèl.lules que romanen adherides a la placa després de ser transfectades. Possiblement, l'espai lliure generat per les cèl.lules que expressen HA-Ciclina O i perden l'adhesió permet el creixement continu i la seva substitució per les cèl.lules no transfectades. En la transfecció control, la inhibició del

creixement per contacte estabilitza el nombre de cèl.lules adherides quan aquestes arriben a l'estat de confluència.

Per tal de quantificar les cèl.lules apoptòtiques amb trencaments del DNA i la proporció de cèl.lules en cada fase del cicle cel.lular, les cèl.lules adherides i flotants de cada transfecció s'han tractat amb iodur de propidi i mitjançant el citòmetre de flux s'ha quantificat el seu material genètic (**Figura 8 C**). En la transfecció control les cèl.lules adherides pateixen una inhibició del creixement per contacte que es fa evident per l'elevada proporció de les cèl.lules aturades a la fase G1. Tanmateix, aquestes presenten una taxa apoptòtica baixa i habitual en aquests cultius cel.lulars.

Com hem dit anteriorment, l'expressió d'HA-Ciclina O incrementa la proporció de cèl.lules flotants i les cèl.lules romanents segueixen creixent i ocupant l'espai lliure fins a substituir totalment les cèl.lules que expressen HA-Ciclina O. En aquest cas no s'observa un increment de les cèl.lules aturades en G1, ja que encara no s'ha donat una inhibició del creixement per contacte, però curiosament tampoc s'observa una major proporció significativa de cèl.lules en fase S respecte la transfecció control. Enlloc de les cèl.lules proliferants esperades s'observa un increment en més de 3 vegades de les cèl.lules que tenen el DNA fragmentat i que probablement perdran l'adhesió a la placa. L'increment de cèl.lules apoptòtiques en detriment d'una major proporció de cèl.lules en fase S suggereix que és en aquesta fase quan la Ciclina O exerceix el seu efecte deleteri.

Pel que fa a les cèl.lules flotants s'observa una gran proporció d'apoptosi en ambdues condicions, indicant que les cèl.lules HEK293 en suspensió tenen la viabilitat compromesa. Tenint en compte que en la transfecció control la proporció d'aquestes cèl.lules és mínima respecte al total, aquesta població cel.lular no es veu significativament afectada. En canvi, en la població transfectada amb pcDNA-HA-Ciclina O les cèl.lules flotants representen una tercera part del total de la població, i en aquest cas uns nivells d'apoptosi pròxims al 50% són significatius. En el conjunt de cèl.lules flotants que expressa la proteïna HA-Ciclina O, l'increment d'apoptosi és en detriment de les cèl.lules en fase S i G2/M, ja que només es manté la proporció de cèl.lules en fase G1 respecte les cèl.lules adherides. Aquests resultats concorden amb els efectes de la Ciclina O en les cèl.lules adherides, però en aquest cas la major proporció d'apoptosi en cèl.lules flotants fa més evident un efecte letal de la Ciclina O durant la fase S. Com a conseqüència d'una disminució de les cèl.lules en aquesta fase també es veuen afectades les proporcions de les cèl.lules en les fases següents del cicle cel.lular, G2 i M.

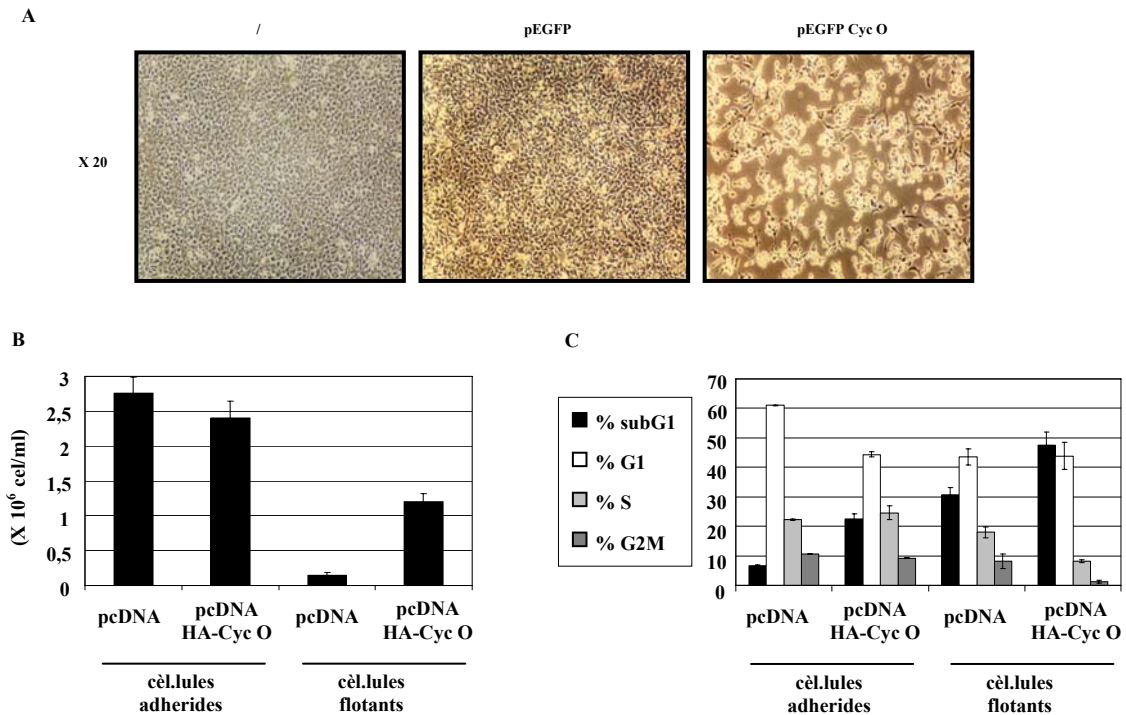


Figura 8. Quantificació de l'efecte apoptòtic induït per la sobreexpressió de la Ciclina O. Imatges de microscopia òptica 48h després de l'expressió transfecció de la proteïna verda GFP, o de la proteïna de fusió GFP-Cyc O, en comparació amb cèl.lules HEK293 no transfectades (A). Quantificació de les cèl.lules adherides i flotants en una placa de cultiu amb cèl.lules HEK293 72h després de ser transfectades amb el plàsmid pcDNA o amb el plàsmid pcDNA HA-Cyc O (B). Quantificació de les fases del cycle cel.lular en cadascuna de les condicions anteriors (C).

1.4 Alteració del cycle cel.lular per la Ciclina O

Com hem vist, la sobreexpressió de l'HA-Ciclina O té un efecte perjudicial en les cèl.lules HEK293, possiblement actuant específicament en la fase S del cycle cel.lular. Malgrat aquest efecte letal s'han aconseguit clons cel.lulars viables que mantenen la capacitat d'expressar nivells baixos, però constitutius, d'HA-Ciclina O. Per estudiar si l'expressió de la Ciclina O altera els nivells d'apoptosi d'aquest cultiu cel.lular, tal com s'observa en les transfeccions transitòries, s'ha analitzat la seva taxa de creixement i el cycle cel.lular respecte els clons control.

Partint d'una mateixa quantitat de cèl.lules en cultiu i quantificant les cèl.lules viables al llarg del temps s'observa com el creixement de la població que expressa HA-Ciclina O és més lent que el creixement de la població control (**Figura 9 A**). Aquest efecte s'ha quantificat tant en clons aïllats com en *pools* que expressen HA-Ciclina O respecte el conjunt de clons control, mostrant un resultat molt similar.

El fet que les poblacions que expressen HA-Ciclina O tinguin una taxa de creixement inferior pot ser la conseqüència de dos fenòmens que es podrien donar simultàniament. Per una banda la taxa de creixement inferior pot ser el resultat d'una taxa de replicació més lenta en les cèl.lules que expressen HA-Ciclina O i al mateix temps, l'expressió d'HA-Ciclina O podria induir un increment d'apoptosi resultant també en una població menor de cèl.lules viables al llarg del temps respecte els clons control.

L'estudi del cycle cel.lular i el grau d'apoptosi d'aquests cultius mitjançant la tinció amb iodur de propidi i la quantificació del DNA al citòmetre de flux no mostra diferències significatives entre les poblacions que expressen HA-Ciclina O i les poblacions control (resultat no mostrat), suggerint que els efectes d'HA-Ciclina O actuen de manera

constant, però no són tan evidents com en la sobreexpressió de les transfeccions transitòries.

Al mateix temps, en les cèl.lules no transformades ni tumorogèniques Baf3 també s'han aconseguit clons induïbles (tet/ON) capaços d'induir l'expressió d'HA-Ciclina O en presència de doxiciclina. Igual que els clons en cèl.lules transformades i tumorogèniques HEK293, els clons en cèl.lules Baf3 són viables malgrat expressar constitutivament uns nivells basals d'HA-Ciclina O baixos en absència de doxiciclina. Aquesta expressió basal és causada per un efecte "leaky" del sistema tet/ON i està per sota el límit de detecció de la proteïna per *western blotting*, tot i que es fa evident analitzant la seva activitat kinasa associada (**Figura 9 B**).

L'estudi de les poblacions clonals de cèl.lules Baf3 demostra com la inducció d'HA-Ciclina O amb doxiciclina és responsable d'una taxa de creixement menor respecte el mateix clon no induït. Per descartar possibles efectes de la doxiciclina en la taxa de creixement, el mateix estudi s'ha realitzat en clons control en presència i absència de doxiciclina sense observar diferències significatives (**Figura 9 B**). Aquests resultats coincideixen plenament amb els resultats obtinguts en els clons de cèl.lules HEK293 i plantegen per segona vegada quin és l'origen d'una taxa de creixement menor.

L'estudi de l'apoptosi en les poblacions de cèl.lules Baf3 que expressen HA-Ciclina O tampoc mostra diferències significatives respecte els clons control, ja sigui en presència o en absència de doxiciclina. Per contra, l'estudi del cicle cel.lular mostra un lleuger increment en la proporció de cèl.lules en fase S en els clons induïts que expressen HA-Ciclina O (resultat no mostrat). Aquest bloqueig en fase S podria repercutir en un lleu increment en el temps de replicació, fet que explicaria la taxa de creixement menor observada després de la inducció de l'expressió d'HA-Ciclina O. Malgrat tot, no es pot descartar un efecte proapoptòtic inapreciable, però constant, causat per l'expressió d'HA-Ciclina O. Juntament amb una alteració del cicle cel.lular aquest efecte també podria ser responsable d'un menor nombre de cèl.lules viables al llarg del temps.

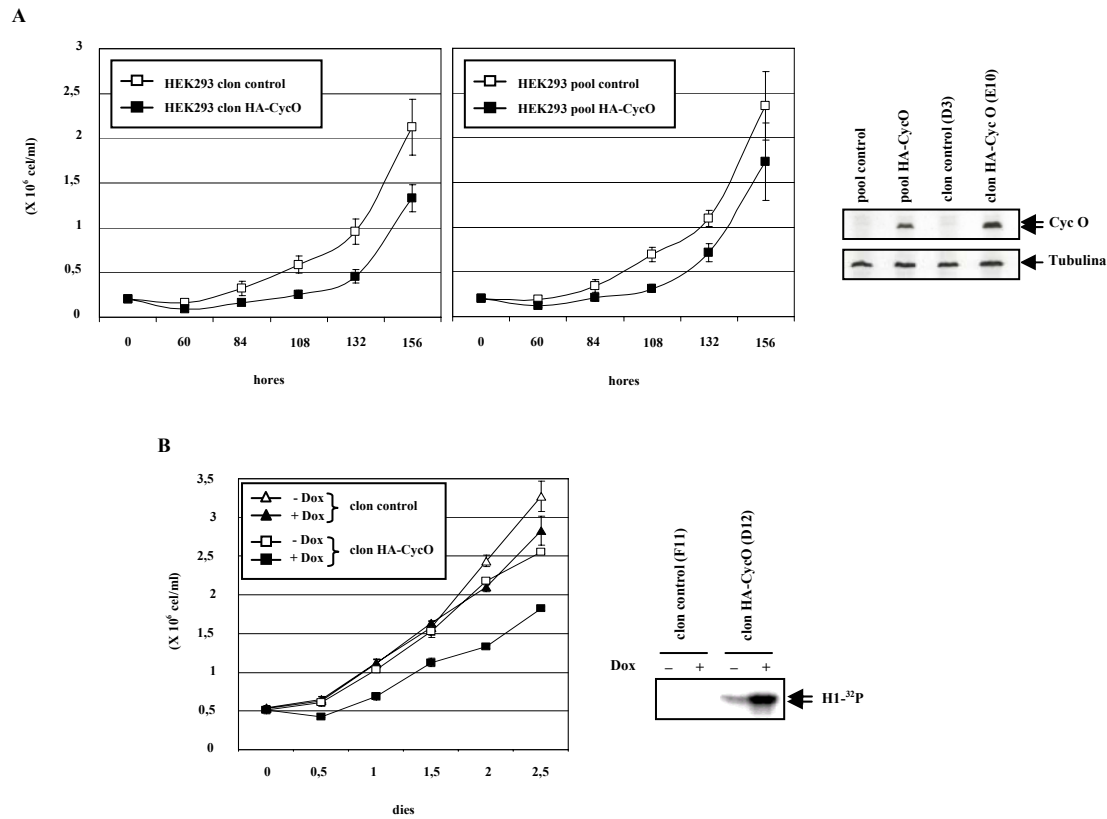


Figura 9. Inhibició del creixement per expressió de la Ciclina O. Comparació de les corbes de creixement d'un clon i el *pool* control de cèl.lules HEK293 enfront d'un clon i el *pool* de cèl.lules HEK293 que expressen la Cyc O de manera constitutiva. El *western blot* de la dreta mostra els nivells d'expressió de la Cyc O, dels *pools* i els clons utilitzats per l'experiment (A). Comparació de les corbes de creixement dels clons de cèl.lules TonBaf en absència o en presència de doxiciclina (2 µg/ml Dox). A la dreta es mostra els nivells d'activitat kinasa associada a la Cyc O, d'1x10⁶ cèl.lules TonBaf dels clons utilitzats per l'experiment (B).

Per determinar la importància de l'alteració del cicle cel.lular degut a la inducció de la proteïna HA-Ciclina O s'ha fet el seguiment d'un cicle cel.lular complet analitzant la proporció de cada fase en presència i en absència de doxiciclina. Per dur a terme aquest estudi s'ha partit d'un cultiu cel.lular sincronitzant el 50% de les cèl.lules en G2/M mitjançant el tractament previ amb nocodazol. El rentat d'aquesta droga inhibidora de la polimerització dels microtúbuls ha marcat l'inici (temps 0h) a partir del qual s'ha fet el seguiment de la progressió sincronitzada del cicle cel.lular (**Figura 10**). La comparació del cicle cel.lular del mateix clon en presència i absència de doxiciclina al llarg del temps indica que la inducció d'HA-Ciclina O no afecta a la progressió del cicle cel.lular des de la sortida de la fase G2/M (temps 0h) fins a la sortida de la fase S (temps 15h). A partir d'aquest punt la inducció d'HA-Ciclina O provoca una elongació de la fase S en el temps (temps 16-22h) mentre en condicions normals, sense doxiciclina, les cèl.lules ja entren en la fase G2/M. La comparació percentual relativa d'ambdós situacions es representa com un increment de les cèl.lules en fase S i una pèrdua simultània de cèl.lules en G2/M.

L'alentiment de la fase S en les cèl.lules que expressen HA-Ciclina O no suposa una aturada del cicle cel.lular, però sí que s'observen conseqüències en la seva progressió. Quan les cèl.lules amb doxiciclina han superat la fase S i entren a la fase G2/M (temps 23h) les cèl.lules en absència de doxiciclina ja han finalitzat el cicle cel.lular i entren en

la propera fase G1. La comparació d'aquestes dues situacions es representa amb un increment de la fase G2/M quan s'expressa HA-Ciclina O respecte la situació control, però no s'observen canvis apreciables en G1.

En conjunt aquests resultats mostren com la proteïna HA-Ciclina O és responsable d'un retard en la sortida de la fase S en conseqüència, hi ha un alentiment i una desincronització de les fases posteriors del cycle cel.lular respecte les cèl.lules control. Aquest fenomen podria explicar la disminució de la taxa de creixement observada en els clons de cèl.lules Baf3 induïbles i en els clons de cèl.lules HEK293 on l'expressió d'HA-Ciclina O és constitutiva.

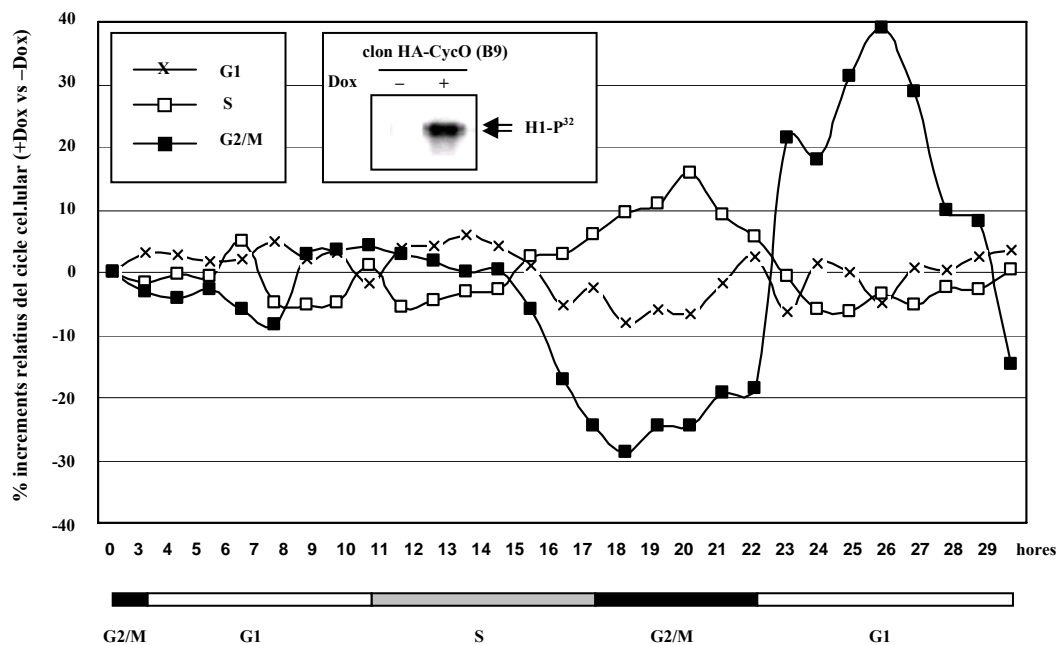


Figura 10. Retard de la sortida de la fase S per l'expressió de la Ciclina O. Seguiment i quantificació de les fases del cycle cel.lular a partir de la sincronització en G2/M (NOC, 5 µg/ml durant 12h) en un clon de cèl.lules TonBaf. Durant les 12h de sincronització i les 29h posteriors s'ha sotmès el clon a la presència o a l'absència de doxiciclina (2 µg/ml Dox). Els resultats mostrats són la diferència percentual relativa entre el cultiu en presència i en absència de doxiciclina. A la base de la figura s'indica la seqüència del cycle cel.lular que segueix el cultiu control, sense doxiciclina, després d'eliminar el nocodazol del medi. A l'interior de la figura es mostra l'activitat kinasa associada a la Cyc O d'1x10⁶ cèl.lules del clon TonBaf utilitzat, en presència i en absència de doxiciclina (2 µg/ml Dox).

Cal tenir en compte que el tractament previ amb nocodazol incrementa la mort cel.lular del cultiu. Per evitar l'acumulació excessiva de cèl.lules mortes s'ha reduït el tractament fins aconseguir una sincronització del 50% en G2/M a canvi de mantenir una viabilitat cel.lular inicial del 90%. En l'anàlisi del cycle cel.lular pel citòmetre de flux al llarg del temps només s'han tingut en compte les cèl.lules amb un fenotip proliferant.

Per descartar possibles alteracions de la doxiciclina i el nocodazol en la progressió del cycle cel.lular el mateix experiment s'ha dut a terme en clons control, sense observar canvis significatius al respecte (resultat no mostrat).

Finalment cal mencionar que la gran proporció de cèl.lules en la fase G1 en els cultius de cèl.lules Baf3, i els clons derivats, fa que els canvis que proporcionalment són importants en les fases S i G2/M no suposin una modificació significativa en la proporció de la fase G1. Aquest fet podria fer inapreciables els canvis de G1 provocats

directa o indirectament per l'expressió d'HA-Ciclina O, com l'esperada disminució de la fase G1 a les 23-29h en comparació amb les condicions control.

1.5 Efecte protector i alteració de l'activació de p53 per la Ciclina O

En els experiments anteriors s'ha observat que la Ciclina O pot tenir un efecte proapoptòtic quan és sobreexpressada en transfeccions transitòries. Malgrat aquest efecte, els clons estables que expressen la Ciclina O de manera constitutiva o induïble (tot i mostrar una activitat basal detectable) no presenten diferències en el nivells d'apoptosi respecte els clons control corresponents. Per tal de mostrar possibles diferències fins al moment inapreciables, s'ha analitzat la resposta dels clons induïbles enfront diferents tractaments inductors de l'apoptosi: privació de factors de creixement i supervivència, addició de drogues inductores dels *checkpoints* de cicle cel.lular i provocant dany al DNA mitjançant radiació gamma.

Les cèl.lules Baf3 són cèl.lules limfocítiques (pre-B) de ratolí dependents de la interleucina IL3. En aquest tipus cel.lular s'ha descrit que l'efecte de la privació d'IL3 durant 24h provoca una aturada del cicle cel.lular en G1 causada per un estat d'hipofosforilació de les *pocket proteins*, pRB i p107, mentre que a les 72h gairebé totes les cèl.lules mostren símptomes apoptòtics, com la fragmentació del DNA (293). Per estudiar l'efecte de la privació d'IL3 en presència de la Ciclina O un clon control i un clon induïble per l'expressió d'HA-Ciclina O s'han cultivat en absència d'IL3 i en presència de doxiciclina. L'anàlisi de la fragmentació del DNA mitjançant la tinció amb iodur de propidi i la quantificació per citometria de flux mostra com l'expressió d'HA-Ciclina O, a diferència de mostrar un efecte proapoptòtic esperat, té un efecte protector enfront el mecanisme de mort cel.lular iniciat per la manca d'IL3 (**Figura 11 A**).

El tractament de les cèl.lules amb nocodazol desestabilitza les estructures del fus mitòtic impedit la correcta alineació dels cromosomes a la placa metafàsica i la posterior segregació cromosòmica. Aquests efectes provoquen una aturada en prometafase degut a l'activació del *checkpoint* mitòtic que pot ser revertida eliminant el nocodazol del cultiu cel.lular. El tractament continuat de les cèl.lules amb nocodazol provoca un arrest permanent a la fase M i l'activació d'un mecanisme de mort cel.lular sensible a l'estructura del fus mitòtic, evitant l'aparició de cèl.lules poliploides de l'organisme. La comparació de la resposta apoptòtica en presència de nocodazol i doxiciclina d'un clon control i un clon induïble per l'expressió d'HA-Ciclina O confirma l'efecte antiapoptòtic de la Ciclina O en els clons Baf3, mostrant una cinètica molt similar a l'observada en la privació d'IL3 (**Figura 11 A**).

El tractament de les cèl.lules a la radiació gamma genera un conjunt variat de lesions al DNA que seran detectades ràpidament per proteïnes sensores. Aquestes proteïnes es situaran al lloc de la lesió i activaran les kinases sensibles al DNA activant una resposta cel.lular que segons el grau de la lesió pot acabar amb la mort de la cèl.lula.

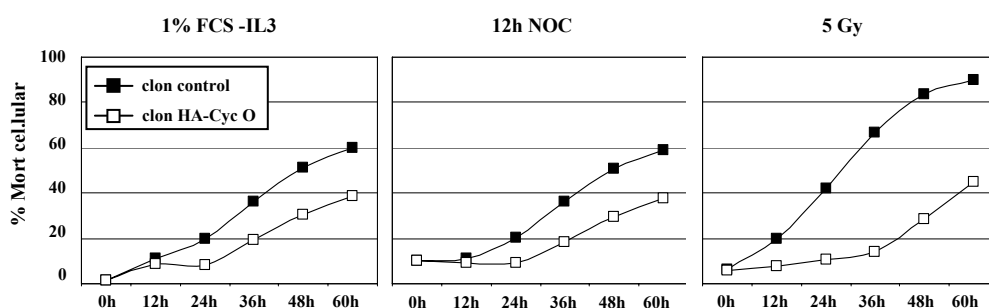
En el tractament d'un clon control i un clon induïble per l'expressió d'HA-Ciclina O a la radiació gamma en presència de doxiciclina s'observa un ràpid increment de la mort cel.lular en els clons control, mentre que l'expressió d'HA-Ciclina O inhibeix l'apoptosi d'una manera similar a la resposta enfront els altres estímuls (**Figura 11 A**). Curiosament, aquest efecte protector de la Ciclina O es manté també en absència de doxiciclina, suggerint que l'expressió basal d'HA-Ciclina O en aquests clons pot ser suficient per frenar la mort cel.lular respecte els clons control.

Analitzant el cicle cel.lular de les cèl.lules viables en aquestes condicions s'observa que la radiació gamma activa el *checkpoint* de G2/M de les cèl.lules Baf3, provocant un

arrest temporal per facilitar la reparació del DNA abans de la mitosi (**Figura 11 B**). A partir de les 12h postirradiació el cicle cel.lular continua per ambdós clons, tot i que la presència d'HA-Ciclina O alenteix la sortida de G2/M, allargant el període en que es pot reparar el DNA abans de ser transmès a les cèl.lules filles. A partir d'aquest moment (24h) les cèl.lules que expressen HA-Ciclina O segueixen proliferant de manera sincronitzada superant la fase G1 (36h) i entrant en la fase S (48h i 60h), mentre que les cèl.lules control aturen la proliferació a la fase G1 (48h) i moren com a conseqüència d'una acumulació de lesions al DNA irreversible.

(Degut a l'elevada mortalitat de les cèl.lules control a les 60h s'observa un petit augment del percentatge de les cèl.lules en fase S com a compensació per la pèrdua de cèl.lules viables aturades en G1).

A



B

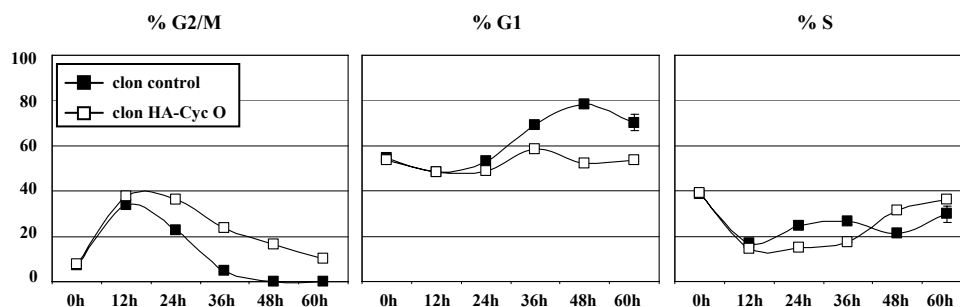


Figura 11. Efecte protector de la Ciclina O enfront la mort cel.lular induïda. Inducció de la mort cel.lular en els clons de cèl.lules TonBaf pels tractaments en absència de factors de creixement (1% FCS i absència d'IL3 durant l'experiment), nocodazol (NOC, 5 µg/ml durant 12h) o radiació gamma (5Gy). Tant el clon control (F11) com el clon que expressa la Cyc O (B9) han estat tractats amb doxiciclina (2 µg/ml Dox) des de 12h abans i durant l'experiment. (A). Quantificació de les fases del cicle cel.lular durant la cinètica de mort cel.lular induïda pel tractament amb irradiació gamma (5Gy) amb els mateixos clons i condicions anteriors (B).

En resposta a l'estrès cel.lular com els estímuls apoptòtics descrits anteriorment, Mdm2 i p53 pateixen modificacions postraduccional que porten a la inactivació de Mdm2 i a l'activació de p53 per iniciar una resposta cel.lular adient. Per contra, una activitat desmesurada de Mdm2 evita permanentment l'activació de p53 promovent la inestabilitat genòmica i la capacitat oncogènica de la cel.lula.

Les cèl.lules Baf3 van ser derivades per subcultiu de moll d'os de ratolí amb interleucina 3 (IL3) i mantenen p53 inalterat i funcional amb capacitat per induir apoptosi. IL3 regula l'activació de p53 a través de l'expressió del seu regulador negatiu Mdm2 (122). Així, les cèl.lules Baf3 exposades al dany al DNA amb radiació gamma

L'absència d'IL3 inhibeix l'expressió de Mdm2 i accelera l'activació de p53 i el procés de mort cel.lular. Aquesta observació no sembla exclusiva d'IL3 sinó que també es dona amb altres factors de supervivència, suggerint l'existència d'un mecanisme proapoptòtic comú regulat pels factors de creixement i p53. La deprivació de factors de creixement també pot causar una disminució ràpida de Mdm2 atribuïble a un increment de la seva degradació a través del proteasoma. Les conseqüències d'aquesta degradació són una creixent activitat apoptòtica de p53 que podria explicar la connexió entre IL3 i p53 a l'hora de regular la supervivència de les cèl.lules Baf3. Així doncs, el tractament apoptòtic de les cèl.lules Baf3 per deprivació d'IL3 i per radiació gamma poden estar convergint en l'activació de p53 com a element comú d'ambdós estímuls apoptòtics.

Per determinar si la protecció dels clons que expressen HA-Ciclina O enfront els diferents estímuls proapoptòtics testats es dona a través dels elements proapoptòtics comuns, s'ha estudiat l'activació de p53 d'aquests clons respecte els clons control. L'activació d'aquest factor de transcripció després d'induir lesions al DNA es dona principalment per la fosforilació al residu Ser15. Així, s'ha irradiat ambdós clons en presència de doxiciclina i s'ha analitzat la fosforilació d'aquest residu per *western blotting* al llarg del temps. Com s'ha vist anteriorment (**Figura 11 A**) a partir de les 12h postirradiació s'observa un increment de l'apoptosi que coincideix amb una activació de p53 en ambdós clons (**Figura 12**). Mentre l'activació de p53 en els clons control és temporal i es recupera l'estat inactiu de p53 abans de les 48h, en els clons que expressen HA-Ciclina O p53 es manté actiu almenys fins a les 60h, suggerint un posicionament d'HA-Ciclina O *upstream* d'aquest supressor de tumors conferint una elongació de la resposta cel.lular enfront les lesions del DNA. Per confirmar l'activació diferencial de p53 degut a la presència d'HA-Ciclina O també s'ha analitzant els nivells d'expressió de dues proteïnes regulades per aquest factor de transcripció: Bax i p21^{Cip1}. En el cas de p21^{Cip1} s'observa una correlació positiva entre l'activació de p53 i la seva expressió, tant en els clons control com en els clons induïts. L'activació inicial de p53 en ambdós clons degut a la irradiació pot explicar l'aturada del cicle cel.lular en G2/M per un increment de la funció inhibidora de p21^{Cip1}. A diferència dels clons que expressen HA-Ciclina O, on l'activitat de p53 i p21^{Cip1} sembla mantenir-se al llarg del temps, en els clons control aquestes activitats disminueixen i poden facilitar la sortida de G2/M i la progressió del cicle cel.lular observades.

En el cas de l'expressió de Bax també s'observa una correlació positiva entre la seva expressió i l'activació de p53 en ambdós clons. Aquest resultat no només confirmen un posicionament d'HA-Ciclina O *upstream* de p53, sinó que suggereixen una intervenció directa o indirecta de la Ciclina O sobre la funció transcripcional de p53.

Malgrat que la inducció inicial de la proteïna Bax pot facilitar la inducció de l'apoptosi en els clons control, la proteïna HA-Ciclina O, o factors dependents d'aquesta, semblen protegir els clons induïbles al llarg del temps.

La radiació gamma pot produir diferents tipus de lesions al DNA, entre elles els trencaments de doble cadena (DSB). Després de produir-se un DSB la Histona H2AX és fosforilada i es localitza ràpidament als foci on s'ha produït el dany. La determinació d'aquesta modificació postraduccionals s'utilitza com a marcador específic de les fases més inicials del DSB després d'irradiació, ja que altres tractaments que no produeixen aquest tipus de lesions, com la irradiació UV o les condicions hipotòniques, no fosforilen ni mobilitzen H2AX.

Confirmant la detecció dels DSBs després de la radiació gamma (**Figura 11 A**), en aquestes condicions també s'observa un major increment dels DSB, i per tant una major fosforilació de la Histona H2AX dels clons control respecte els clons que expressen la proteïna HA-Ciclina O. Aquests resultats ratifiquen un cop més la correlació entre la

presència de l'HA-Ciclina O i la protecció enfront de l'apoptosi. La presència uniforme de la proteïna PCNA a totes les mostres evidencia que els resultats observats no són atribuïbles a diferències inicials en els nivells totals de proteïna.

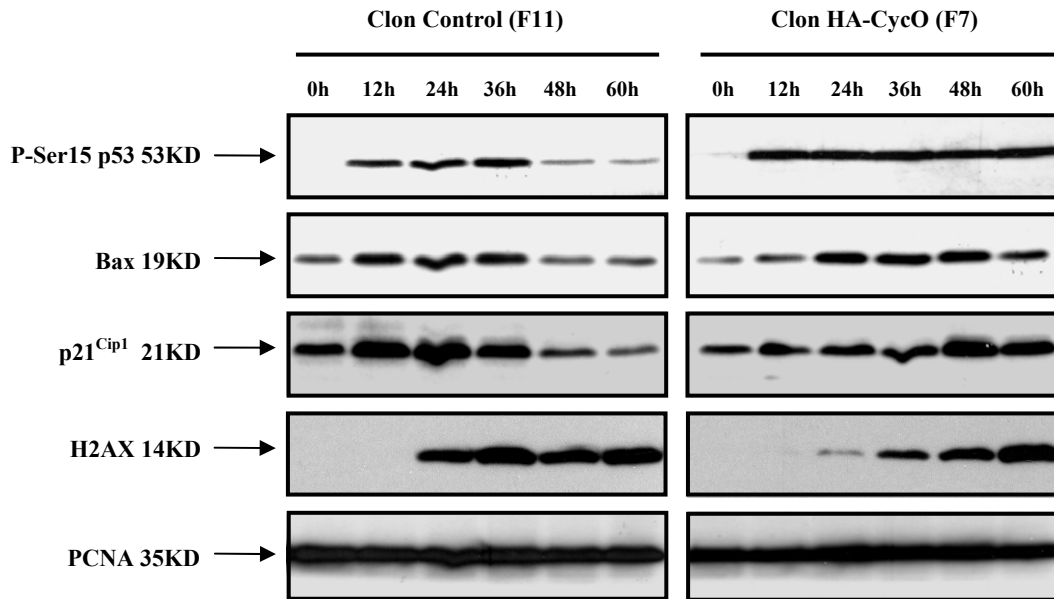


Figura 12. Manteniment de la inducció de p53 i efecte protector del dany al DNA per l'expressió de la Ciclina O en cèl.lules Baf3. Un clon control i un clon induïble per l'expressió d'HA-Ciclina O prèviament tractats amb doxiciclina (2mM Dox) durant 12h han estat sotmesos a la radiació gamma (5Gy). Els *western blot* mostren la quantificació del dany al DNA a través de la fosforilació de la Histona H2AX i la comparació dels nivells d'activació de p53 i dos dels seus gens diana, Bax i p21^{Cip1}, durant les hores posteriors al tractament d'irradiació en presència de doxiciclina (2μM Dox).

2 Discussió

2.1 Formació del complex Ciclina O-Cdk2 *in vitro*

S'han proposat dues teories a l'hora d'explicar l'abundància de les subunitats ciclina (339). En una es postula que cada ciclina és bioquímicament diferent de les altres i pot catalitzar la fosforilació de substrats específics, mentre que l'altra sosté que les diferents ciclins i cdk's són fonamentalment les mateixes, però existeixen en diferents formes per assegurar una regulació ajustada en el temps i en l'espai. Segons aquesta, l'evolució a partir d'un sol complex ha acabat refinant el control del cicle cel.lular existent actualment en els mamífers, ja que una única ciclina mitòtica pot regular la replicació del DNA i la segregació cromosòmica en *S.Pombe*, mentre que en *S.cerevisiae* les quatre ciclins mitòtiques i les dues ciclins interfàsiques, poden ser substituïdes per una sola ciclina mitòtica. De la mateixa manera, en mamífers la progressió de G1 a S no sembla dependre exclusivament de les ciclins D, ni les ciclins E, ni Cdk2 o Cdk4/6, ja que cadascuna d'aquestes proteïnes pot rescatar la pèrdua de qualsevol altra per dur a terme la fosforilació de pRB o p107.

Malgrat aquesta redundància també hi ha diferències bioquímiques entre les diferents ciclins de mamífers, ja que p.ex. la Ciclina E és incapaç d'induir la mitosi. Malgrat tot, calen estudis més acurats per diferenciar els efectes evolutius responsables de l'oportunisme tempo-espacial dels efectes de l'especificitat bioquímica.

Des del seu clonatge *in silico* l'homologia de la Ciclina O amb la seqüència *cyclin box*, especialment de la Ciclina A2, ja suggerí la possibilitat d'actuar amb Cdk2. Els experiments realitzats *a posteriori* demostren l'existència del complex actiu Cdk2-Ciclina O, però també suggereixen l'existència d'altres complexos actius amb Ciclina O, especialment al cervell. En aquest teixit, l'existència d'una elevada activitat kinasa associada a la Ciclina O en un entorn lliure de Cdk1 i Cdk2 implica la possibilitat d'una interacció activadora de Ciclina O amb altres proteïnes cdk homòlogues com per exemple Cdk5. Aquesta kinasa només és activa en cervell, representant fins al moment l'única excepció de la família cdk que pot ser activada per p35, una proteïna no homòloga a la família de les ciclins (178). El complex actiu Cdk5-p35 no sembla tenir un paper important en la regulació del cicle cel.lular ja que actua principalment en la funcionalitat de les neurones postmitòtiques.

Tenint en compte les dues teories anteriors la formació del complex Cdk2-Ciclina O sembla participar en la regulació del cicle cel.lular i l'apoptosi, tal com suggereixen els experiments en línies cel.lulars i en teixits embrionaris (veure **Capítol 4, apartat 2.2 i Capítol 9, apartat 3.1 i 3.4**), mentre que al sistema nerviós central l'expressió elevada de la Ciclina O en condicions normals (veure **Capítol 8, apartat 2.1**) no respon a cap criteri proliferatiu o proapoptòtic. Aquestes evidències suggereixen la formació d'altres complexos d'aquesta ciclina en cervell, possiblement amb altres proteïnes cdk i amb una funció totalment diferent, com per exemple: la preservació de la condició postmitòtica i/o la viabilitat enfront diferents agents lesius.

Aquests dos exemples antagònics poden ser una mostra de la varietat de funcions que duen a terme les ciclins, i en aquest cas la Ciclina O, dependent del teixit, el tipus cel.lular i la presència d'una o altra cdk.

2.2 Localització nuclear i/o citoplasmàtica de Ciclina O

Tal com hem vist, la Ciclina O és present al nucli i al citoplasma, i sembla posseir motius NLS i NES que podrien regular aquesta distribució. Per estudiar la importància d'aquestes seqüències, actualment estem generant mutants la distribució cel.lular dels quals ens aportarà informació en aquest sentit.

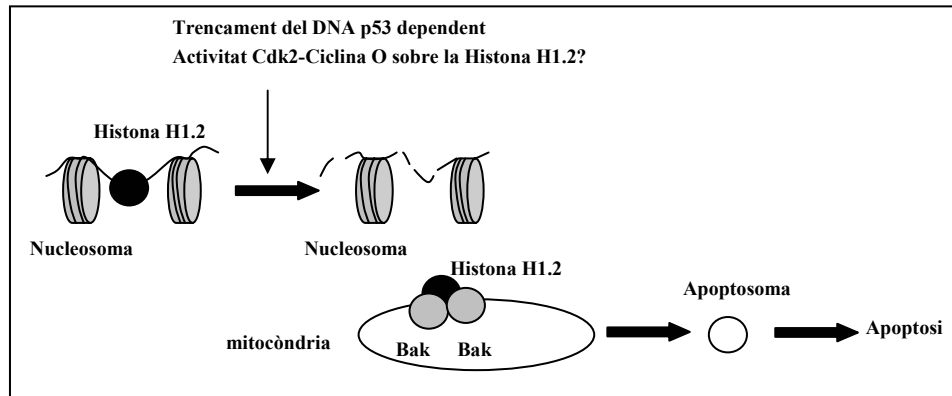
Un dels factors que poden condicionar la distribució i la funció de la Ciclina O és la seva interacció amb determinades proteïnes. Aquestes interaccions podrien ser responsables d'un canvi estructural afavorint l'exposició d'una de les seqüències de localització (NLS o NES) i promovent una localització determinada en funció, per exemple, del cicle cel.lular. Així, s'ha demostrat que el complex Cdk2-Ciclina A pot estar present al nucli i al citoplasma, ja que ambdues proteïnes semblen tenir una NLS. Tanmateix, Cdk2 interacciona amb PCNA formant el complex PCNA-Cdk2 i actuant en els mecanismes de repació del DNA (194). Aquest complex es localitza al nucli durant tot el cicle cel.lular, però també és present al citoplasma durant la fase S. La proteïna PCNA no té una seqüència NLS, indicant que Cdk2 podria dirigir la translocació de PCNA del citoplasma al nucli durant la fase S. En aquest sentit es poden diferenciar dos *pools* entre els complexos Cdk2-ciclina, ja que una part d'aquests complexos està lliure entre el nucli i el citoplasma, mentre que l'altra part formarà el trimer PCNA-Cdk2-ciclina que es concentra majoritàriament al nucli, on executa la seva funció reparadora. Fins al moment no tenim evidències de la formació del trimer PCNA-Cdk2-Ciclina O, però la identificació de proteïnes que interaccionin amb el complex Cdk2-ciclina O pot ser determinant per entendre la funció i la distribució nuclear de la Ciclina O.

2.3 Obtenció de clons amb expressió constitutiva de la Ciclina O

En condicions d'expressió transitòria la presència de la Ciclina O resulta en un increment de l'apoptosi. A l'hora de generar clons d'expressió constitutiva en cèl.lules HEK293 l'obtenció de clons positius es dona amb una freqüència menor que l'obtenció dels clons control, indicant que la Ciclina O pot estar exercint efectes deleteris per la viabilitat cel.lular. Aquest efecte també s'observa en la generació de clons induïbles en cèl.lules Baf3 utilitzant el sistema tet/ON. En aquests clons l'absència de l'inductor doxiciclina hauria de mantenir l'expressió de la Ciclina O apagada i de fet, en aquestes condicions la proteïna és indetectable per *western blotting*. Tanmateix, la sensibilitat dels assajos kinasa permet detectar nivells baixos, però permanents, d'activitat kinasa associats a la Ciclina O. Aquesta activitat kinasa basal en absència de doxiciclina podria ser suficient per alterar la viabilitat cel.lular i dificultar la generació de clons positius per l'expressió de la Ciclina O respecte els clons control. El mecanisme d'aquest efecte letal encara no és conegut, però en els experiments duts a terme amb aquests clons s'observa com l'expressió de la Ciclina O correlaciona amb una major activació de p53 i un augment de la proteïna proapoptòtica Bax com a resultat de la inducció de dany al DNA.

A més, l'activitat kinasa del complex Cdk2-Ciclina O fosforila la Histona H1 *in vitro*, i podria actuar sobre la variant internucleosomal H1.2 *in vivo*. La Histona H1.2 és alliberada al citosol després del trencament de les dobles cadenes de DNA de manera dependent de p53 (76), però caldria estudiar si aquesta mobilització depèn de fenòmens de fosforilació, en aquest cas del complex Cdk2-Ciclina O. La histona alliberada es transloca a la mitocòndria i, tot i no tenir cap domini BH3, s'ha descrit que promou l'oligomerització de Bak, l'alliberament del Citocrom C i l'activació de les caspases efectores (76) (**Esquema 1**). Així, el *linker* internucleosomal H1.2 pot ser utilitzat per la

cèl.lula com a senyalitzador intermediari, detectant els canvis en l'estructura de la cromatina i comunicant-los amb la maquinària mitocondrial.



Esquema 1. Possible efecte del complex Cdk2-Ciclina O sobre l'activació de la Histona H1.2 i la seva migració mitocondrial.

En conjunt encara es desconeixen els mecanismes d'actuació de la Ciclina O i caldrà estudiar si aquestes vies proapoptòtiques s'activen i són responsables de l'increment de mortalitat observat en condicions d'expressió de la Ciclina O.

Malgrat aquesta inducció apoptòtica inicial, finalment s'han pogut obtenir clons viables que mantenen l'expressió de la Ciclina O constitutiva en cèl.lules HEK293 i clons induïbles en cèl.lules Baf3. En conjunt, aquestes dades suggereixen l'existència d'adaptació cel.lular que fan compatible l'expressió de la Ciclina O amb la viabilitat cel.lular.

2.4 Alteració de la fase S per l'expressió de Ciclina O

L'anàlisi de la taxa de creixement mostra com l'expressió de la Ciclina O en els clons generats en cèl.lules HEK293 i en cèl.lules Baf3 augmenta el temps de duplicació de la població cel.lular. L'observació de l'efecte letal de la Ciclina O en les transfeccions transitòries suggereix que un temps de duplicació superior podria ser degut a una taxa apoptòtica constant i intrínseca de la població que expressa la Ciclina O. Tot i que aquest efecte no s'ha pogut demostrar, no es pot descartar que sigui parcialment responsable del fenomen d'alentiment del creixement poblacional.

Una segona possibilitat per explicar el retard en el creixement de la població que expressa la Ciclina O suposa que aquesta proteïna afecta negativament la progressió del cicle cel.lular. En els clons Baf3 s'ha demostrat que un increment en el temps de la fase de síntesi del DNA pot ser el causant d'aquest retard en el temps de duplicació, suggerint que aquest efecte també es pot donar en els clons de cèl.lules HEK293, i fins i tot en les cèl.lules HEK293 transfectades abans de patir apoptosi. En aquest últim cas el cultiu de cèl.lules control ha arribat a la confluència i estan aturades majoritàriament a la fase G1, mentre que el cultiu transfectat amb pcDNA-HA-Ciclina O està en creixement continu aprofitant l'espai alliberat per les cèl.lules flotants. En aquestes condicions s'esperaria observar una proporció de cèl.lules en fase S superior respecte el cultiu control aturat en G1, tanmateix no és així. L'increment de les cèl.lules apoptòtiques, encara adherides, en el cultiu transfectat amb pcDNA-HA-Ciclina O

prové possiblement de les cèl.lules en fase S que falten respecte el control. Aquest fet indicaria que l'inici dels efectes letals de la Ciclina O es donen també a la fase S.

2.4.1 Possibles mecanismes de la Ciclina O en l'alteració de la fase S

Tot i que els complexos cdk-ciclina tenen diferents substrats *in vivo*, en els assajos kinasa experimentals s'ha utilitzat la Histona H1 com a substrat comú pels diferents complexos cdk-ciclina que regulen el cicle cel.lular (excepte els complexos cdk-Ciclina D) i per la Ciclina O. Aquesta proteïna conté un domini central globular flanquejat per dues cues flexibles riques en Ser (71). En aquest estat les cues no fosforilades estan carregades positivament i apantallen les càrregues negatives del DNA, facilitant la interacció amb les fibres de cromatina. La Histona H1 s'uneix al complex del nucleosoma, prop del punt d'entrada i sortida del DNA i té un paper important en l'estabilització d'estructures de la cromatina, en la inhibició de la replicació del DNA i en la regulació transcripcional (71).

Durant les fases G1 i G2 la Histona H1 es fosforila a les cues dels dominis N i C-ter pel complex Ciclina E-Cdk2, Ciclina A-Cdk2 i Ciclina A-Cdk1, arribant al màxim estat fosforilat a les fases S i M, respectivament (71). Com a conseqüència de la fosforilació els grups negatius dels fosfats afebleixen les interaccions entre les cues de la histona i el DNA, afeblint al mateix temps les estructures compactes de les fibres de cromatina. Per tant, la fosforilació de la Histona H1 resulta en una estructura relaxada del DNA i una creixent accessibilitat dels enzims que modifiquen la cromatina i faciliten l'activitat de les maquinàries transcripcional i replicatives. Així, mentre la Histona H1 no fosforilada es localitza entre la cromatina electrodensa, la Histona H1 fosforilada està associada a l'eucromatina en interfase.

Tot i que el complex Ciclina O-Cdk2 podria fosforilar diferents substrats encara desconeguts, hi ha diferents mecanismes moleculars que podrien explicar l'efecte inhibitori de la fase S a través de l'activitat del complex Ciclina O-Cdk2. Entre aquests mecanismes, es podrien anomenar els següents:

1-Increment de la fase S dependent d'E2F

Com a conseqüència d'uns nivells elevats de fosforilació de la Histona H1 degut a l'expressió de la Ciclina O exògena és possible que diferents factors de transcripció, com E2F1, els sigui més fàcil l'accés al DNA i exercir la seva funció transcripcional. L'acció transcripcional d'E2F1 comporta un increment en l'expressió dels gens diana tals com el gen de la Ciclina A i de la Ciclina E i la conseqüent entrada del cicle cel.lular en la fase S (69).

Com mostra el fenotip de les cèl.lules que sobreexpressen E2F1 i la Ciclina E, la degradació de la Ciclina E és necessària per donar pas a l'activitat dels complexos amb Cdk1 i a la mitosi. Per tant, l'expressió exògena de la Ciclina O podria estar afectant els nivells totals de la Ciclina E en fase S, causant un retard en l'inici de les etapes posteriors. En aquest cas, la progressió del cicle cel.lular serà possible quan els nivells de la Ciclina E hagin disminuït gràcies a la degradació proteasomal, donant pas a la fase G2 i a la mitosi.

2-Increment de fase S dependent de Cdc25A

La sobreexpressió de Cdc25A té capacitat transformant en les cèl.lules MEF i la seva correcta activació i degradació és indispensable per la progressió de G1 a S. La regulació transcripcional de Cdc25A s'ha atribuït a E2F i c-Myc, dos factors de transcripció dependents de cicle cel.lular que incrementen l'mRNA de Cdc25A just abans de la fase S, anticipant el seu paper activador del complex Cdk2-Ciclina E (324,387). A la vegada, Cdc25A és fosforilat per Cdk2-Ciclina E generant un *loop feedback* positiu que incrementa l'activitat d'ambdós proteïnes, curiosament una fosfatasa i una kinasa, fins a nivells suficients per superar la progressió de G1 a S (87). A través d'aquest mecanisme i un increment de l'activitat transcripcional d'E2F induïda per l'activitat kinasa del complex Cdk2-Ciclina O sobre la Histona H1 es podria reforçar l'increment de la fase S i el retard en la progressió del cicle cel.lular induït per la sobreexpressió de les Ciclines A i E.

3-Aturada en fase S dependent de Cdc25A

Encara és poc clar com ATM, ATR i altres kinases similars són activades pel dany al DNA (93). Actualment es creu que els sensors de dany al DNA, possiblement proteïnes Rad, són reclutats als llocs on les forquetes es queden estancades i serveixen com a estructura per l'ancoratge i activació de les kinases ATM i ATR.

En condicions de dany al DNA, com és el cas de l'exposició a la radiació gamma, l'activació d'ATM i ATR reforcen l'aturada del cicle cel.lular a la fase G2 a través de l'activació de Chk1/2 i la inhibició de les activitats de Cdc25A i Cdc25C (296).

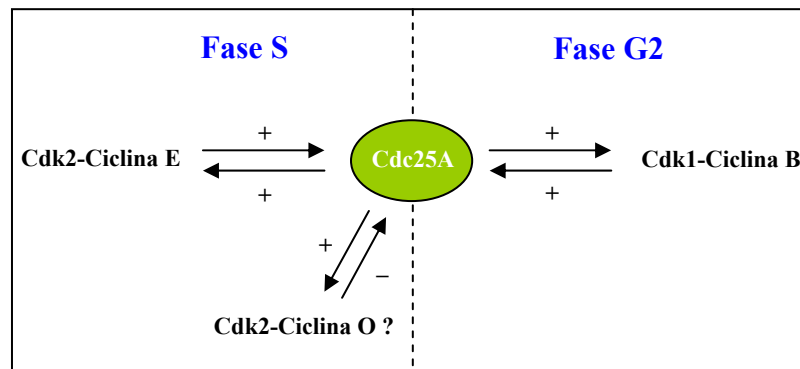
En condicions normals, tot i la capacitat dels complexos Cdk2-Ciclina E per exercir un *loop feedback* positiu amb Cdc25A, els tractament amb roscovitina i l'ús de dominants negatius demostren que l'activitat de Cdk2, però no de Cdk1 o Cdk3, actua desestabilitzant Cdc25A i contribuïnt a la naturalesa làbil de Cdc25 en interfase (G1, S i G2) (87). No és fins a l'activació de Cdk1-Ciclina B, a finals de G2, que hi ha una clara estabilització de Cdc25A causant un increment dels nivells d'aquesta proteïna en G2/M que permeten la seva funcionalitat encara desconeguda en aquesta fase.

També en condicions normals la degradació de Cdc25B està regulada per la prèvia fosforilació del complexos Cdk1-Ciclina B i la posterior degradació proteasomal de Cdc25B, mentre que l'activitat de Cdc25C està regulada principalment pel segrest citoplasmàtic i la inactivació a través de la interacció amb la proteïna 14-3-3 σ , facilitant la conseqüent degradació pel proteasoma. En canvi, els mecanismes que regulen l'estabilitat de Cdc25A en absència de l'activació dels *checkpoints* de S i G2 encara estan poc clars, però la naturalesa làbil de la proteïna Cdc25A en interfase suggereix la possibilitat d'un efector *upstream*, tal com actua el complex Cdk1-Ciclina A amb Cdc25B (87).

Tenint en compte els resultats amb l'ús d'un dominant negatiu de Cdk2 un candidat a regular la degradació de Cdc25A en interfase podria ser un dels complexos amb aquesta kinasa i per tant, no es pot descartar la participació del complex Cdk2-Ciclina O en aquesta funció (**Esquema 2**).

Recentment s'ha mostrat que Cdc25A es pot associar a diferents lligases d'ubiquitina iniciant la seva degradació proteasomal (173). Diferents elements reguladors del cicle cel.lular, com l'inhibidor p27^{Kip1} i la Ciclina E, es converteixen en dianes d'aquestes lligases després de ser fosforilats, suggerint que Cdc25A podria seguir un mecanisme del mateix tipus després de la fosforilació per complex amb Ciclina O. Així, l'activació

de Cdk2-Ciclina O i la degradació de Cdc25A podria inhibir l'activació dels complexos Cdk2-Ciclina E i frenar la progressió de la fase S, tal com s'observa en els clons cel.lulars Baf3.



Esquema 2. Possible efecte del complex Cdk2-Ciclina O sobre la inestabilitat de Cdc25A durant la fase S.

4-Retard en fase S dependent de PCNA

Com s'ha dit anteriorment, Cdk2 pot interaccionar amb la proteïna PCNA i formar part de macrocomplexes juntament amb les proteïnes RPA i UNG2 (194). PCNA i aquestes proteïnes co-localitzen *in vivo* amb les forquetes de replicació i semblen intervenir en la síntesi del DNA i en la reparació de la incorporació errònia de nucleòtids. En aquest context, la sobreexpressió de la Ciclina O podria alterar l'equilibri de la interacció de Cdk2 amb aquests complexos afectant la maquinària de síntesi i reparació del DNA que finalment s'observaria fenotípicament com un lleu retard en la fase S.

2.5 Alteració del *checkpoint* de la fase G2 per l'expressió de Ciclina O

2.5.1 Aturada en G2 dependent de p53 i p21^{Cip1}

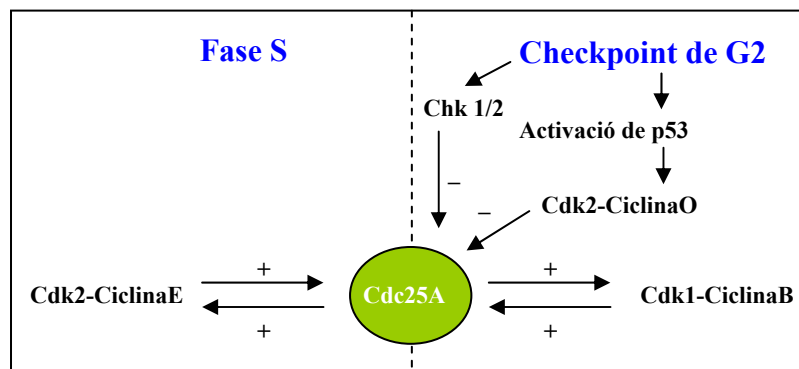
En el *checkpoint* de G2 induït pel tractament amb irradiació gamma s'observa un increment temporal de la fosforilació activadora de p53 i una inhibició consecutiva a les 48h postirradiació en els clons control de cèl.lules Baf3. En els clons que expressen la Ciclina O l'activació de p53, determinada per la fosforilació al residu Ser15, es manté almenys fins a les 60h postirradiació. Aquest increment de la resposta cel.lular a la radiació en presència de la Ciclina O afecta també a les dianes de p53 com Bax i p21^{Cip1}, i probablement també a la Ciclina B.

En condicions de dany al DNA la degradació de Cdc25A, Cdc25C i l'activació dels *checkpoints* de S i G2 requereixen la fosforilació de les kinases Chk1/2. Aquests mecanismes són bàsicament independents de p53, però no es pot descartar la participació de p53 activa en els *checkpoints* de G2 a través de la repressió del gen de la Ciclina B1 (195) i la inducció de l'expressió de la proteïna 14-3-3σ i l'inhibidor p21^{Cip1}, com s'ha observat en presència de la Ciclina O. L'acumulació de l'inhibidor p21^{Cip1} al llarg del temps postirradiació inhibeix el cicle cel.lular i afavoreix el *checkpoint* de G2 en els clons que expressen la Ciclina O, observant una sortida lenta de la fase G2 en comparació amb les cèl.lules Baf3 control irradiades.

2.5.2 Aturada en G2 dependent de Cdc25A

En condicions normals l'activació del complex Cdk1-Ciclina B està regulada principalment per Cdc25C, però en la fase G2 també s'ha descrit un increment dels nivells de Cdc25A que podrien ser parcialment responsables d'aquesta activació. L'augment de Cdc25A es deu possiblement a la inhibició del mecanisme que regula la seva degradació en interfase, i sobretot, a l'estabilització en mitosi a través de la fosforilació per Cdk1-Ciclina B.

L'activació de p53 després del tractament amb radiació gamma sembla afavorir la inducció de l'expressió de la Ciclina O (veure **Capítol 3, apartat 2A 2.1 i Capítol 4, apartat 2.2**). Com a mecanisme de reforç en l'aturada de G2 en condicions d'irradiació, la presència d'aquesta ciclina en el *checkpoint* de G2 podria afectar l'estabilitat de Cdc25A a través de la seva fosforilació prèvia pel complex Cdk2-Ciclina O i facilitar el posterior reconeixement i la fosforilació efectora per les kinases Chk1/2 (**Esquema 3**). Aquest mecanisme, juntament amb la reducció dels nivells de la Ciclina B i la inducció de p21^{Cip1} i de 14-3-3σ a través de l'activació de p53 (195) podrien ser suficients per perllongar el *checkpoint* de G2 com s'observa en els experiments.



Esquema 3. Possible efecte del complex Cdk2-Ciclina O sobre la inestabilitat de Cdc25A en el *checkpoint* de G2

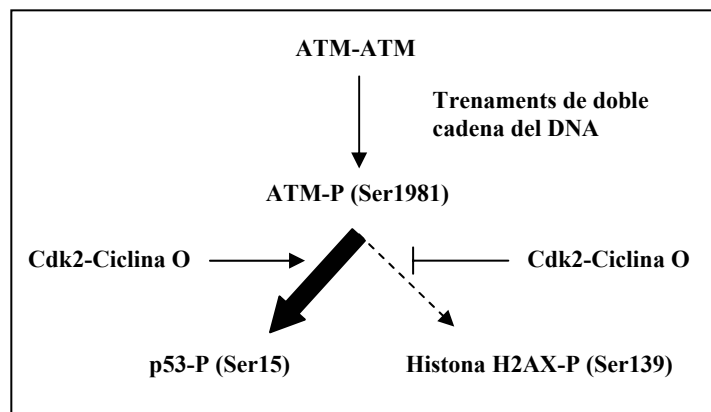
2.6 Efecte antiapoptòtic de la Ciclina O *upstream* d'ATM?

L'augment de l'expressió de Bax, la principal diana proapoptòtica de p53, al llarg del temps postirradiació sembla produir un increment d'apoptosi esmorteït en presència de la Ciclina O. El bloqueig de l'efecte de Bax en els clons que expressen la Ciclina O podria ser el resultat d'una selecció clonal per fer compatibles les dues característiques seleccionades; la viabilitat cel.lular i l'expressió de la Ciclina O. Considerant l'existència d'un bloqueig en la ruta apoptòtica de Bax, els clons positius per la Ciclina O semblen mostrar preferentment l'activitat reparadora de p53.

El retard en la sortida de la fase G2 i la constant activació de p53 poden mantenir en funcionament els sistemes de reparació del DNA durant més temps repercutint en una major viabilitat cel.lular i en una activació menor de la Histona H2AX en els clons que expressen la Ciclina O. En conjunt, aquests resultats mostren com els efectes *downstream* de la Ciclina O són tan diversos com l'activació de p53 i la fosforilació de la Histona H2AX.

ATM i ATR són les principals kinases responsables de l'activació de p53 a través de la fosforilació al residu Ser15, malgrat que l'activitat kinasa de Chk1 i Chk2 també pot tenir aquesta funció (143). La fosforilació de la Histona H2AX al residu Ser139 també es dona per ATM quan aquesta kinasa s'ha activat degut a la producció de DSBs al DNA (174). En aquest cas ATM és autofosforilada al residu Ser1981 dissociant la seva estructura dimèrica inactiva i estimulant la seva activitat kinasa, mentre que altres tipus de dany al DNA on no hi ha l'activació d'ATM, tot i detectar-se l'activació d'ATR i la conseqüent activació de p53, no indueixen la fosforilació d'H2AX. Després del dany al DNA la Histona H2AX fosforilada es localitza ràpidament als foci lesionats, probablement senyalitzant els trencaments per ser reparats (297).

L'activació de p53 i H2AX no formen part d'una sola via, sinó que ATM sembla poder activar ambdós proteïnes per separat (174), indicant que aquesta kinasa apical és l'element convergent de dues vies susceptibles de ser regulades per la Ciclina O. Així, el complex Cdk2-Ciclina O podria actuar inhibint l'activitat kinasa d'ATM sobre H2AX i dirigint-la cap a la fosforilació i activació de p53 (**Esquema 4**). Finalment, la fosforilació d'H2AX també es detecta inespecíficament en estadis tardans d'apoptosi, quan hi ha una fragmentació massiva del DNA genòmic, tal com s'observa a temps llargs postirradiació en presència de la Ciclina O.



Esquema 4. Possible efecte del complex Cdk2-Ciclina O sobre l'activitat d'ATM activada per trencaments de doble cadena del DNA.

2.7 Efecte apoptòtic de la Ciclina O *upstream* d'ATM

Com s'ha descrit anteriorment, en situacions de dany al DNA i formació de DSBs l'activació d'ATM comporta l'activació de les kinases Chk1/2, el supressor de tumors p53 i la Histona H2AX, entre d'altres. Al mateix temps l'activitat kinasa de Ciclina O-Cdk2 sobre la Histona H1 podria tenir conseqüències en la transcripció gènica a través de factors de transcripció com E2F1 (71).

La combinació de l'expressió de la Ciclina O i la inducció de DSB al DNA a través del tractament amb radiació gamma hem vist que comporta un conjunt de canvis entre els quals cal destacar un increment de l'activitat de p53 i les seves dianes *downstream*, i un retard considerable de la fosforilació de la Histona H2AX al llarg del temps respecte els clons control irradiats.

Curiosament, la sobreexpressió d'E2F1 activa transcripcionalment el promotor del gen *atm* i produeix la fosforilació de p53 de manera dependent d'ATM i Chk2 a uns nivells comparables al tractament amb radiació ionitzant (IR) o amb etopòsid, però a diferència

d'aquests estímuls la sobreexpressió d'E2F1 no causa dany al DNA ni mobilitza l'H2AX (308).

Tenint en compte aquest conjunt de fenòmens, els efectes observats en presència de la Ciclina O, de la mateixa manera que l'alteració del cycle cel.lular, també podrien ser explicats per un increment transcripcional d'E2F1 com a conseqüència de l'activitat kinasa del complex Cdk2-Ciclina O. Malgrat tot, la irradiació dels clons induïbles no comporta el mateix grau d'activació i mobilització d'H2AX que s'observa en els clons control, indicant que la presència de la Ciclina O podria inhibir la seva fosforilació alterant directament, o a través d'E2F1, l'activitat d'ATM.

Així, l'activació de p53 a través d'ATM i Chk2 sense la fosforilació d'H2AX semblen ser característiques comunes entre la sobreexpressió d'E2F1 (308) i la sobreexpressió de la Ciclina O. Caldrà doncs analitzar, si efectivament l'activitat kinasa d'aquesta última podria afavorir l'activitat transcripcional d'E2F alterant el cycle cel.lular i l'apoptosi.

2.8 Redundància de la Ciclina D2 i Ciclina O en absència d'IL3

Com la resta de cèl.lules hematopoètiques, les cèl.lules BaF3 necessiten la presència de citoquines pel seu continu creixement i supervivència. Les cèl.lules BaF3 són cèl.lules murines limfocítiques (pre-B) dependents d'IL3 per la seva supervivència i amb p53 inalterat (293). La interleucina 3 (IL3) és una citoquina pleiotròpica generada per cèl.lules T activades, monòcits, macròfags i per cèl.lules estromals capaç de regular funcions com la proliferació, la supervivència i la diferenciació en diferents cèl.lules hematopoètiques. L'efecte d'IL3 està mediat per la unió a través del seu receptor específic, format per una subunitat α i una cadena β també compartida per altres receptors de citoquines, incluint els d'IL5 i GM-CSF. A través del domini citoplasmàtic de la cadena β diverses vies senyalitzadores com la via de Ras, la via de PI3K i la via de JAK/STAT s'han vist implicades en la senyalització dependent d'IL3.

La privació d'IL3 durant 24h causa una hipofosforilació de les *pocket proteins* pRB i p107 provocant l'arrest de les cèl.lules BaF3 a la fase G1 i un increment de l'apoptosi a partir de les 48h (293). Malgrat tot, aquests efectes poden ser revertits amb l'addició de nova IL3 recuperant la proliferació cel.lular i evitant la progressió posterior cap a l'apoptosi observada a partir de les 48h en absència d'IL3.

Un dels events més primerencs com a conseqüència de la privació d'IL3 és la disminució de l'expressió de la Ciclina D2 (293). La sobreexpressió d'aquesta ciclina en les cèl.lules BaF3 evita l'aturada i l'apoptosi induïda per la privació d'IL3, indicant que la Ciclina D2 és un component essencial en la via de transmissió de senyals a través del receptor d'IL3. A la vegada, l'expressió de la Ciclina D2 manté l'estat hiperfosforilat de les *pocket proteins* en absència d'IL3, suggerint que està situada *upstream* d'aquestes proteïnes i del factor de transcripció E2F.

La sobreexpressió de la Ciclina D2 també evita la disminució de la Ciclina D3 i de la Ciclina E, així com l'acumulació de p27^{Kip1}. La reversió d'aquests canvis, típicament observats en la privació d'IL3, posiciona el gen de la Ciclina D2 com un dels elements més *upstream* de la via apoptòtica induïda per la manca de factors de creixement i el fan responsable de la regulació de l'expressió de la Ciclina D3, la Ciclina

E i p27^{Kip1}, mentre que l'expressió de Cdk2, Cdk4 i Cdk6 es mostra invariable en absència d'IL3 (293).

En conjunt, els efectes *downstream* de la Ciclina D2 són molt similars als observats en condicions d'expressió de la Ciclina O, ja que en absència d'IL3 la presència d'aquesta ciclina és capaç de mantenir la proliferació i la viabilitat cel.lular, encara que de forma menys evident que després de l'estrès induït per la radiació gamma. Així, sembla que l'activitat kinasa del complex Cdk2-Ciclina O podria actuar de manera redundat als complexos amb Ciclina D2, probablement incrementant l'activitat dels factors E2F com s'ha proposat anteriorment, o fosforilant directament alguna de les *pocket proteins*.

Objectiu:

**4-Estudi del mecanismes de regulació
de l'activador apoptòtic de Cdk2**

Capítol 3. Regulació de la Ciclina O

1A Introducció a la regulació transcripcional

1.1 Introducció al supressor tumoral p53

En més de la meitat dels tumors humans hi ha una pèrdua de funció de p53, i en la major part dels tumors que mantenen p53 funcional s'observen defectes en la inducció de la resposta de p53 (149). El supressor tumoral p53, anomenat també “guardià del genoma”, té la capacitat d'aturar la proliferació cel.lular i induir l'apoptosi en resposta al dany cel.lular (212). Encara que aquesta proteïna no sembla necessària pel creixement i desenvolupament de l'organisme, és important per la prevenció del desenvolupament de tumors, ja que pot contribuir directament a la reparació del DNA, a la inhibició de l'angiogènesi i té l'habilitat de frenar el creixement de les cèl.lules anormals (6,343,390). Aquesta habilitat evita el creixement de cèl.lules tumorals i va associada a la diferenciació, a la senescència o a l'apoptosi.

p53 pot actuar a diferents estadis en la progressió d'un tumor, ja que hi ha diferents fenòmens que es poden donar en el desenvolupament tumoral que tenen la capacitat d'activar p53 (p.ex: dany al DNA, erosió dels telòmers, senyals de proliferació aberrants, hipòxia, pèrdua d'adhesió cel.lular i manca de senyals de supervivència). Principalment actua com a factor de transcripció i s'uneix en forma de tetràmer a una seqüència específica del DNA, activant o reprimint un gran conjunt de gens (91). Els gens induïts es poden dividir en dues categories principals de regulació independent; els gens responsables de l'aturada del cicle cel.lular i de la reparació del DNA, i els gens que medien la resposta apoptòtica (391).

A més d'actuar induïnt l'expressió gènica, també s'han descrit altres funcions proapoptòtiques de p53 com a repressor transcripcional, a través de la interacció amb desacetilases d'histones(264), i exercint funcions independents de la transcripció. Aquestes encara són poc conegudes, però també semblen contribuir a la funció proapoptòtica de p53. (p. ex: p53 sembla tenir una funció mitocondrial i pot intervenir en la relocalització dels “death receptors”, com FAS, de l'aparell de Golgi a la superfície cel.lular) (231).

1.1.1 Localització subcel.lular i estabilitat de p53

Moltes de les funcions de p53 depenen de la regulació de la transcripció i per tant, de la seva localització al nucli . Hi ha tres senyals d'import nuclear a l'extrem C-ter de p53 la mutació de les quals comporta una acumulació de p53 al citoplasma i la pèrdua de la capacitat d'aturar el creixement cel.lular (333).

p53 també es pot unir als microtúbuls utilitzant aquesta xarxa viària i la proteïna Dineïna com a motor molecular per traslladar-se del citoplasma al nucli (118). L'export del nucli depèn de les seqüències d'export nuclear de p53 i aquestes també juguen un paper important en la seva degradació (203), ja que al citoplasma p53 és degradat pel proteasoma a través del seu regulador negatiu Mdm2 (107).

A la vegada *mdm2* és un gen diana de p53 establint un *feedback loop* en el qual p53 dirigeix l'expressió del seu propi regulador negatiu (269). Mdm2 és un dels principals components de la regulació de p53, i amb aquest *loop* es contribueix a disminuir

l'activitat de p53 en cèl.lules no estressades (211). En condicions d'estrès com l'exposició a radiació UV, hipòxia i a algunes drogues citotòxiques es redueixen eficientment els nivells de l'mRNA de Mdm2. Aquesta reducció és transitòria, ja que l'increment de l'activitat de p53 comportarà l'expressió de Mdm2. Tanmateix, la inhibició inicial és suficient per desequilibrar el *feedback negatiu* i desencadenar la resposta de p53 en aquestes condicions.

La deleció de Mdm2 causa la letalitat embrionària per apoptosi en les primeres etapes del desenvolupament (78). Aquesta letalitat pot ser rescatada amb la deleció de p53, permetent un creixement i un desenvolupament normal de l'animal, encara que amb propensió al desenvolupament de tumors (170,255). Aquest rescat mostra la capacitat proapoptòtica de p53 fins i tot en estadis embrionaris, i indica com n'és d'essencial Mdm2 en la seva regulació.

Mdm2 interacciona amb la regió N-ter de p53, on hi ha el principal domini d'activació transcripcional (251). Amb aquesta interacció Mdm2 impedeix la unió de p53 als co-activadors inhibint la seva funció transcripcional (392), però a la vegada Mdm2 pertany a la família RING-finger dels enzims del tipus E3, i s'encarrega de transferir molècules d'ubiquitina a p53 iniciant la senyalització per la conseqüent degradació proteasomal (94,246). La mutació del domini RING-finger de Mdm2 inhibeix la capacitat ubiquitina lligasa i permet establir el complex Mdm2-p53.

Encara que Mdm2 dirigeix p53 cap a l'acció del proteasoma, la unió de Mdm2 amb p53 és nuclear i permet l'export de p53 cap al citoplasma, on es donarà la degradació. Curiosament, la Lys de p53 on s'uneix la cua d'ubiquitines està al C-ter de la proteïna, dins de la regió d'export nuclear. Per tant, és possible que el procés d'ubiquitinació alteri la conformació d'aquesta regió de p53 fent el procés d'export irreversible.

En la major part dels teixits hi ha uns nivells baixos de p53 degut a la curta vida mitjana d'aquesta proteïna, ja que és degradada ràpidament a través de l'acció de Mdm2 i del proteasoma. A la vegada, també s'han descrit altres processos degradatius que actuen sobre p53 com la degradació per Calpaïna, necessària per la progressió del cicle cel.lular (197).

A més d'unir-se a p53, Mdm2 pot unir-se a p14 (ARF) afectant a p53. ARF és un polipèptid petit codificat pel locus INK4a i la seva unió amb Mdm2 indueix l'activitat de p53 a través de dos mecanismes; p14 pot inhibir l'activitat ubiquitina lligasa de Mdm2 (246) i a la vegada dirigir la localització de Mdm2 al nucleol, afavorint l'acumulació de p53 i evitant la seva degradació citoplasmàtica (220).

La proteïna Mdm2 actua formant homodimers, però també pot formar heterodimers amb MdmX *in vivo* i *in vitro*. La proteïna MdmX és similar a Mdm2 i conté dominis homòlegs; incluint el domini d'unio a p53, un motiu ZINC-finger i un motiu RING-finger a l'extrem C-ter (332,363). Els heterodimers Mdm2-MdmX són més estables que els homodimers d'Mdm2, ja que la interacció d'aquestes dues proteïnes inhibeix l'activitat ubiquitina lligasa de Mdm2 atenuant l'habilitat de Mdm2 de mediar la seva pròpia ubiquitinació i la de p53. Així, tot i que MdmX no sembla capaç d'ubiquitinar i degradar Mdm2, s'ha mostrat que pot modular la ubiquitinació i transactivació de p53 juntament amb Mdm2 (116,317). L'absència d'una de les dues és incompatible amb la vida de l'embrió de ratolins més enllà del dia 13, i en ambdós casos la letalitat pot ser rescatada amb un *background* deficient en p53 (294).

A diferència de Mdm2, que s'expressa d'una manera dependent del cicle cel.lular, MdmX s'expressa de manera constant sense alterar-se pel cicle cel.lular, el creixement o la diferenciació (295). En moltes cèl.lules MdmX està al citoplasma, però el dany al

DNA i un increment de l'activitat de p53 indueixen la seva translocació al nucli (127,248). Aquesta translocació afavoreix també la translocació de Mdm2 al nucli, on comença l'activitat ubiquitina lligasa de Mdm2, es formen els complexos Mdm2-p53 i s'indueix l'export de p53 al citoplasma per ser degradat. En condicions de dany al DNA i la formació dels heterodímers tots aquests fenòmens queden aturats i s'afavoreix l'acumulació de Mdm2 i de p53 activa.

Mdm2 també pot interaccionar amb pRB bloquejant la degradació de p53 mitjançant la formació del trímer p53-Mdm2-pRB. Aquest complex és incapaç d'activar els gens diana de p53, però pot reprimir l'expressió d'altres gens i per tant, induir apoptosi (151).

1.1.2 Regulació postraduccional de les funcions de p53

p53 està format per quatre dominis funcionals que regulen la seva activitat com a factor de transcripció: un domini transactivador N-ter necessari per la interacció amb elements de la maquinària de transcripció (19), un domini central d'unió a seqüències específiques del DNA (60), un domini de tetramerització que facilita la unió amb el DNA (67) i un domini C-ter que regula negativament les funcions de p53 a través de la interacció amb el DNA (153).

Hi ha diferents nivells en la regulació de p53 que inclouen el control transcripcional, traduccional i postraduccional de la proteïna, però en condicions de dany cel.lular la resposta més immediata desencadena modificacions postraduccional que afecten a l'activitat de p53 modificant la compartimentalització, l'estabilitat i l'afinitat de la proteïna al DNA. La manera més efectiva de controlar l'activitat de p53 és regulant la seva unió al DNA, i és al domini central d'unió al DNA on es detecten la major part de mutacions de p53 en tumors. Al mateix temps també s'inicien mecanismes que afectaran a la transcripció i traducció de p53 per tal d'incrementar els nivells de proteïna i la durada de la resposta. La pròpia resposta de p53 farà que alguns dels seus gens diana limitin la seva activació i es recuperi l'estat normal de la cèl.lula supervivent.

p53 pot ser fosforilada en diferents residus agrupats als dominis N i al C-ter, on s'inclouen dianes per diferents kinases cel.lulars (veure **Taula 1**).

	Kinasa/es	Condicions	Conseqüències
N-terminal			
Ser15	ATM/ATR Chk1/Chk2	radiació ionitzant, senescència, quiescència	increment de l'estabilitat i interacció amb p300/CBP
Thr18	Chk1/Chk2?	radiació ionitzant, senescència	increment de l'estabilitat
Ser20	Chk2	constituti, radiació ionitzant	<i>feedback</i> negatiu
C-terminal			
Ser315	Cdk-ciclina	transició S-G2	export nuclear, <i>feedback</i> negatiu
Ser392	CKII	?	import nuclear, augment de l'afinitat pel DNA

Taula 1. Principals residus fosforilables a l'extrem N i C-terminal de p53.

L'N-ter de p53 és un domini regulador que conté 15 aminoàcids conservats responsables de la unió de p53 amb l'efector postiu p300/CBP, o amb l'inhibidor Mdm2 (154). En condicions d'irradiació s'observa la fosforilació dels residus Ser15, Thr18 i/o Ser20 (73,320,373). Aquestes modificacions estan dins la zona d'unió de p53 a Mdm2 i/o p300/CBP i per tant afecten aquestes dues vies, el balanç de les quals modularà l'efecte final de p53.

La fosforilació a la Ser15 facilita la unió de p300/CBP a l'extrem N-ter de p53 i conseqüentment, la mutació d'aquest residu redueix l'activitat com a factor de transcripció *in vivo* (374). Les kinases ATM, ATR, Chk1 i Chk2 són activades en condicions de radiació ionitzant, quiescència i senescència cel.lular i poden fosforilar la regió N-ter de p53 (23,204,370). ATM i ATR semblen ser multifuncionals en l'activació de p53. Per una banda activen la seva funció transcripcional fosforilant directament la Ser15 (319), i a la vegada activen les kinases Chk2 i Chk1 respectivament, tot i que hi ha cert grau d'activació creuada (50,143,340). L'activació d'aquestes dues kinases permet la fosforilació directa de p53 al lloc d'unió a Mdm2 reduïnt la seva interacció i incrementant l'estabilitat de p53. Per una altra banda ATM també és capaç de fosforilar Mdm2 a la regió d'interacció amb p53, impeding aquesta unió i estabilitzant els nivells de p53 (179).

Les fosforilacions a la Thr18 i a la Ser20 mostren un tipus de regulació diferencial que depèn del context cel.lular i de l'agent causant del dany al DNA, però actuen desestabilitzant la interacció p53-Mdm2 i/o estabilitzant p53-p300/CBP. La fosforilació a la Thr18 és freqüent en càncers humans i s'indueix durant la senescència i la radiació ionitzant de manera transitòria (320,400). La fosforilació a la Ser20 sembla ser constitutiva i formar un *pool* de p53 transcripcionalment competent per unir-se a p300/CBP i induir l'expressió de p21^{Cip1} i Mdm2 en cèl.lules proliferants. Aquest *pool* de p53 fosforilat a la Ser20 s'encarrega de mantenir el *feedback* de regulació negativa per evitar la sobreactivació de p53 (34,73). La fosforilació a la Ser20 també pot ser induïda per la radiació ionitzant a través de Chk2. En aquestes condicions s'estabilitza la unió p53-p300/CBP de manera estable i activa per tal d'induir l'expressió dels gens diana de p53 (50,143).

Altres kinases com JNK, p38, CK1 i CAK també semblen de fosforilar l'N-ter de p53. S'ha suggerit que els canvis dependents de cicle cel.lular i del dany al DNA poden modificar l'N-ter de p53 regulant la seva interacció amb JNK, de la mateixa manera que s'ha demostrat amb p300/CBP i Mdm2.

L'extrem C-ter de p53 també és una diana per a moltes modificacions postraduccionals, afectant a la unió al DNA *in vivo*. La fosforilació d'aquests residus incrementa l'activitat com a factor de transcripció en resposta al dany al DNA en condicions en que els nivells de p53 no varien, suggerint que la senyalització del dany al DNA a través del domini C-ter de p53 no estabilitza la proteïna, però n'activa la funció (153). El principal lloc de fosforilació del domini C-ter és el residu Ser315. Aquest residu és fosforilat *in vitro* i *in vivo* i sembla ser un bon lloc de fosforilació pels complexos ciclina-cdk actius durant les fases S i G2 (30,396). Aquesta fosforilació *in vitro* induïx una major afinitat de p53 al DNA possiblement a través de la cooperació amb altres modificacions al C-ter o a l'N-ter. Una elevada fosforilació a les seqüències consens per cdk, a través del tractament de les cèl.lules amb àcid okadaic, incrementa l'activitat específica de p53 en la unió als promotors de p21^{Cip1} i Mdm2 representant una limitació de la resposta de p53 (219). A la vegada, la mutació S315A o l'ús de

roscovitina redueixen l'activitat específica de p53 com a factor de transcripció *in vivo* (33,219).

Per tant, sembla que la fosforilació de Ser315 de p53 pot tenir un efecte activador de la transcripció, però induïnt específicament el *feedback negatiu* per recuperar l'estat normal de la cèl.lula. Consistent amb aquesta funció la fosforilació de la Ser315 també pot causar la desestabilització dels tetràmers de p53.

La Ser392 és un altre residu fosforilable del C-ter de p53 a tenir en compte i sembla actuar de manera contrària a la fosforilació sobre la Ser315 (321). La fosforilació a la Ser392 facilita la unió específica al DNA reduïnt la barrera energètica d'activació, possiblement estabilitzant el tetràmer. La fosforilació d'aquest residu per la kinasa CKII pot activar eficientment la unió al DNA i la funció transcripcional de p53 afavorint la seva localització nuclear. Per contra, la fosforilació per cdk pot conduir a l'export nuclear de p53 (218). Consistent amb aquest canvi de localització induït per l'acció dels complexos cdk-ciclina, s'han descrit fosfatases que actuen sobre la Ser315 acumulant p53 al nucli (214).

Com s'ha dit anteriorment p300/CPB afavoreix l'activitat transcripcional de p53 interaccionant amb l'N-ter. Aquesta interacció també comporta l'acetilació a la Lys 382 del C-ter de p53 (319). La fosforilació a l'N-ter i l'acetilació al C-ter promouen la unió de p53 al DNA (128), contribuïnt a l'habilitat de p300/CBP per funcionar com a co-activador de p53. ATM i ATR actives poden fosforilar a l'N-ter de p53 per afavorir la unió de p300/CBP al C-ter de p53 i la seva acetilació (415). La inhibició de l'acetilació per les histones desacetilases, o per la interacció amb Mdm2, comporta una reducció de l'activitat transcripcional de p53 (187).

p53 també és una de les proteïnes diana de la sumoilació a un dels residus Lys ubiquïtinables. Sumo és una proteïna petita semblant a la ubiquïtina que s'uneix a proteïnes diana a través d'una cascada enzimàtica, de manera similar a la ubiquïtinació. Curiosament, l'addició de grups sumo incrementa l'activitat transcripcional de p53 sense modificar l'estabilitat de la proteïna (259). Aquesta modificació de p53 està regulada per fosforilació, mostrant la dependència que hi ha entre diferents modificacions postraduccionalmentals (259). La coincidència entre sumoilació i ubiquïtinació sobre el mateix residu pot mostrar la compensació dels seus efectes contraris segons el context cel.lular. Aquest cas s'observa clarament en la sumoilació de la proteïna Mdm2, evitant la ubiquïtinació del residu Lys446 en condicions normals. En condicions d'estrès aquest residu és ubiquïtinat i s'accelera la degradació de Mdm2 afavorint l'acumulació de p53.

També s'han descrit altres modificacions com glicosilació i ribosilació, afectant l'estabilitat i l'activitat transcripcional de p53 (386).

1.2 p53 i apoptosi

La primera evidència on es mostren les capacitats de la proteïna p53 endògena per controlar l'apoptosi ve d'experiments fets en timòcits de ratolins deficientes per aquest factor de transcripció. Aquestes cèl.lules sobreviuen als estímuls apoptòtics i desenvolupen tumors amb facilitat, demostrant que p53 atenua o contraresta la progressió tumoral a través de la mort per apoptosi (63,222).

p53 pot ser activada per dany al DNA, hipòxia o expressió aberrant d'oncogenes promovent els *checkpoints* del cicle cel.lular, la reparació del DNA, la senescència cel.lular o l'apoptosi. Com a conseqüència, la pèrdua de p53 promou la presència

d'alteracions en els *checkpoints*, la immortalització cel.lular, la inestabilitat genòmica i la supervivència inapropiada, permetent la proliferació continuada i l'evolució de les cèl.lules danyades. Donada l'avantatge proliferativa que comporta la pèrdua de p53 no és d'extranyar que p53 sigui un gen inactivat en la majoria dels càncers humans (25,155).

Encara que molts estudis s'han centrat en la inactivació de p53, la seva activació crònica és igualment perjudicial. De fet, la hiperactivació de p53 s'ha associat amb diferents malalties degeneratives (ex: artritis, esclerosi múltiple, neuropaties i isquèmies) (192). Estudis realitzats en models de ratolí mostren certa similitud entre l'activació aguda de p53 i els efectes dels agents usats en quimioteràpia, mentre que una activació crònica de p53 té unes efectes més semblants a un procés d'envelliment (192). Aquests resultats indiquen que cal una activació ajustada de p53, ja que en els casos d'excés o defecte són deleteris per la cèl.lula (109).

1.2.1 Activació de les rutes apoptòtiques

p53 és un factor de transcripció que s'uneix a seqüències específiques del DNA (186), i l'activitat proapoptòtica principal de p53 és a través de la seva activitat transcripcional, activant alguns gens de coneguda activitat proapoptòtica. Aquesta activitat és essencial per promoure l'apoptosi, ja que els mutants de p53 transcripcionalment inactius són incapaçs d'induir apoptosi, tot i mantenir la capacitat d'unir-se al DNA (166).

Aparentment, la unió més directa entre l'activitat transcripcional de p53 i l'apoptosi és a través de la regulació d'alguns gens proapoptòtics de la família Bcl-2 com Bax, Puma, Noxa i Bid. En tots aquests gens els promotors tenen seqüències d'unió a p53 i la seva expressió governada per p53 desplaça l'equilibri existent entre els membres pro- i antiapoptòtics de la família Bcl-2 afavorint l'alliberament de proteïnes apoptogèniques del mitocondri i la mort per apoptosi (270,282,325).

p53 sembla mediar l'apoptosi principalment a través de la via apoptòtica intrínseca a la cèl.lula, controlant transcripcionalment factors desconeguts que actuen *upstream* de la mitocondria i factors efectors que actuen *downstream*. Dos exemples de la regulació *downstream* són Apaf1, un co-activador de la Caspasa 9 en l'inici de l'activitat de les caspases efectores i la Caspasa 6, una de les caspases efectores capaç de sensibilitzar les cèl.lules a la quimioteràpia. Aquest punt de control *downstream* no sembla essencial per l'inici de l'apoptosi, però potencia l'efecte amplificador i irreversible del Citocrom C alliberat (224).

La via apoptòtica extrínseca a la cèl.lula també sembla estar regulada per p53, ja que alguns dels gens diana de p53 són Fas/CD95, DR5 i FasL (226,288,418). Malgrat tot, la contribució de p53 en aquesta via encara no està molt clara. A la vegada, p53 per regular la transcripció del membre de la família de Bcl2, Bid, facilitant el *crossstalk* entre la via intrínseca i la extrínseca (325).

1.2.2 Activació de gens inhibidors de la supervivència

p53 no només estimula l'expressió de gens proapoptòtics, sinó que també pot induir gens que frenen o atenuen la vies antiapoptòtiques o de supervivència. Una d'aquestes dianes de p53 és la fosfatasa lipídica PTEN capaç d'inhibir l'acció de la kinasa d'Akt/PKB (389). Les citoquines de supervivència comporten l'activació de tirosina kinases (ERK) sensibles a les variacions de l'entorn exterior de la cèl.lula. Aquestes

quinases sensibles al medi extern activen la kinasa Akt/PKB a través de PI3K. La kinasa Akt/PKB activa fosforila molècules com la proteïna proapoptòtica Bad, inhibint la seva activitat, i estimula la supervivència modulant el metabolisme cel·lular i induint la proliferació. p53 pot transactivar PTEN promovent l'increment de la seva expressió, encara que de forma modesta (109). Malgrat aquests petits canvis d'expressió la disrupció de PTEN compromet l'apoptosi dependent de p53 en alguns tipus cel·lulars i en alguns tumors, indicant la importància de la inducció de PTEN per p53 (354). p53 també pot induir l'expressió d'un conjunt de gens que estan implicats en el metabolisme oxidatiu, alterant la funció dels enzims reductors que protegeixen la cèl·lula de les espècies reactives de l'oxigen (ROS) (303).

1.2.3 Repressió de gens de supervivència

p53 també sembla contribuir a l'apoptosi reprimint l'expressió d'alguns gens (223). Tot i que el funcionament d'aquest mecanisme repressor encara no està clar, s'ha suggerit que és a través de la seva habilitat reclutant histona desacetilases (264). Una de les dianes de p53 que poden ser reprimides es Survivin, una proteïna capaç d'inhibir l'apoptosi. Les mutacions de p53 que contribueixen a la sobreexpressió de Survivin s'observen en alguns tumors (147). Tanmateix, en certes circumstàncies com són les situacions d'hipòxia, s'ha descrit que les activitats repressores de p53 poden superar les transactivadores a l'hora d'induir l'apoptosi, suggerint que hi pot haver més gens importants per la supervivència regulats per mecanismes similars.

1.2.4 Accions no transcripcionals de p53

p53 també pot exercir un control no transcripcional sobre l'apoptosi, encara que en la major part d'aquests estudis el mecanisme descrit passa per la sobreexpressió de mutants de p53, fet no massa habitual en els tumors *in vivo* (39,89,190).

Altres estudis indiquen que en algunes situacions d'estrès hi pot haver una acumulació de p53 a la mitocondria, comportant l'alliberació del Citocrom C i l'activació de caspases de manera dependent de p53. Aquest efecte mitocondrial de p53 és proapoptòtic, ja que la localització mitocondrial de p53 en cèl·lules deficientes per p53 té un efecte letal (249).

Malgrat tot, la funció proapoptòtica principal de p53 està mediada per la seva unió al DNA, ja que la major part de tumors mostren mutants de p53 defectius en aquesta unió i els mutants defectius en la transcripció gènica són capaços de bloquejar l'apoptosi per p53. Així, les activitats no transcripcionals de p53 poden ser importants en cert tipus de respostes o d'estímuls específics, però en conjunt semblen tenir un paper més aviat auxiliar en l'apoptosi (109).

1.2.5 Coordinació del programa apoptòtic per p53

p53 actua simultàniament sobre diferents dianes i d'aquesta manera és capaç de coordinar el procés apoptòtic a través de diferents i múltiples circuits. Per exemple, els timòcits deficientes en Apaf1 responen normalment a l'apoptosi, amb molts casos amb activació de Caspasa 9, a través de gens homòlegs a Apaf1. Això explica perquè la manca d'un sol efector de p53 no sol afectar seriosament la resposta apoptòtica de p53, tot i que hi pot haver "nòduls crítics" més conservats encarregats de la inducció de diferents efectors redundants o alternatius (233). A la vegada, com que cada inducció funciona com una gran xarxa enlloc d'haver-hi un sol circuit linial, els múltiples circuits

es poden veure alterats per diferents factors com el tipus cel.lular, el tipus d'estímul apoptòtic o el *background* genètic (109). Clarificar tots els possibles mecanismes alternatius pot representar un gran repte, però ofereix la possibilitat d'una teràpia més selectiva contra el programa apoptòtic de p53 en un l'entorn de cada teixit o de cada tipus cel.lular concret.

Fins aquí la coordinació de la resposta de p53 està feta segons un model quantitatiu, on les conseqüències de l'activació de p53 són les mateixes amb independència del circuit escollit per arribar a la mort de la cèl.lula. Malgrat tot, els factors contextuais (el *background* genètic, o l'estatus d'altres vies senyalitzadores de la cèl.lula, o l'etapa del cicle cel.lular en que es troba la cèl.lula al moment de la inducció de p53) segurament intervenen en com la cèl.lula interpreta la senyal de p53, mostrant també un fort comportament qualitatiu en la resposta final de p53. Per exemple: en les cèl.lules MEF l'expressió de l'oncoproteïna Myc altera la resposta de p53 induint apoptosi enlloc d'un bloqueig en G1 com s'observa en les cèl.lules WT (198).

1.3 p53 i els *checkpoints* de cicle cel.lular

p53 pot influenciar el cicle cel.lular formant complexos amb diferents proteïnes i a través de la seva funció com a factor de transcripció.

La sobreexpressió de p53 activa el *checkpoints* del cicle cel.lular bloquejant la cèl.lula a les fases G1 i/o G2, evitant la replicació del DNA danyat i la inestabilitat genòmica de les cèl.lules filles que podria propiciar l'aparició de clons cel.lulars immortals (369). Malgrat tot, les respostes de p53 *in vivo* sobre el cicle cel.lular són complicades d'interpretar a causa dels events independents de p53. Així, la pèrdua de p53 elimina l'arrest en G1 en resposta al dany al DNA, però les cèl.lules danyades s'aturen igualment en G2, suggerint que el possible paper de p53 en l'aturada a G2 no és indispensable (296).

En el *checkpoint* de G1 p53 exerceix la seva funció principalment a través de la inducció de p21^{Cip1}, inhibint els complexos cdk-ciclina necessaris per a la progressió de G1 a S (348). El mecanisme pel qual p53 indueix part de l'aturada en G2 s'ha atribuït a la inducció transcripcional dels gens Gadd45 α , 14-3-3 σ i també a p21^{Cip1} (369).

La proteïna Gadd45 α és capaç de dissociar Cdk1 de la Ciclina B1 i per tant, inactiva el complex en el *checkpoint* de G2/M induït per l'exposició a radiació ionitzant (167). El gen 14-3-3 σ conté un element de resposta a p53 en el seu promotor i és capaç de controlar el bloqueig en G2 a través de la retenció al citoplasma de Cdc25. L'activitat de la fosfatasa Cdc25 al nucli és necessària per l'activació dels complexos cdk-ciclina a través de la defosforilació del residu Thr161 de Cdk1. D'aquesta manera p53 impedeix l'activació de Ciclina B-Cdk1 en el *checkpoint* de G2 (46).

La inducció de l'inhibidor p21^{Cip1} pot reprimir l'activitat del complex Cdk1-Ciclina B, tanmateix, la unió de p21^{Cip1} a Cdk1 sembla ser bastant ineficient (134).

A part de la inducció de la transcripció gènica de Gadd45 α , 14-3-3 σ i p21^{Cip1}, p53 també actua com a repressor de la transcripció. La inhibició de l'expressió de la Ciclina B sembla ser el principal mecanisme que utilitza p53 per estabilitzar l'arrest en G2 (66). Confirmant la importància d'aquest mecanisme hi ha estudis que mostren com la sobreexpressió de la Ciclina B pot evitar l'arrest de G2 imposat per la sobreexpressió de p53, i com l'activitat kinasa de la Cdk1 i l'activitat kinasa associada a la Ciclina B disminueix després de la inducció de p53. Aquesta reducció en l'activitat no es deu a canvis transcripcionals o postraductionals aparents en Cdk1, sinó que hi ha una disminució en els nivells de l'mRNA i de la proteïna Ciclina B després de la activació

de p53 (195). El temps de devallada dels nivells de l'mRNA de la Ciclina B precedeixen l'aturada de G2 i l'aparició de cèl.lules apoptòtiques posterior. En mamífers, la Ciclina B existeix en dues isoformes; però tant la Ciclina B1 com la Ciclina B2 mostren el mateix comportament enfront l'activació de p53 (195).

Com s'ha vist, hi ha múltiples vies per les quals p53 pot estar implicat en els *checkpoints*, que poden explicar les diferents respostes en funció del tipus cel.lular, ja que no sempre es detecta un doble arrest en G1 i en G2 després de la inducció de p53. Alguns dels mecanismes que s'activen en aquests *checkpoints* són redundants i dependent del context cel.lular poden cooperar i/o reforçar la senyal de p53 perquè aquest supressor de tumors pugui activar els *checkpoints* de G1 i de G2 alhora (66).

Com s'ha vist *in vivo*, hi ha altres mecanismes independents de p53 que regulen el bloqueig a la fase G2. El principal control de l'aturada de G2 independent de p53 és a través de la fosforilació d'ATM i ATR (65,315). Aquestes kinases sensibles al dany al DNA fosforilen i activen Chk1 i Chk2 (48), i aquestes són capaces de fosforilar i inactivar la fosfatasa Cdc25 (111). L'efecte final resulta similar a la inducció de 14-3-3 σ per p53, però el fet que en absència de p53 es mantingui l'arrest de G2 després d'induir dany al DNA suggereix que el mecanisme independent de p53 és més eficient o quantitativament més important (66).

L'activació d'ATM/ATR i les kinases Chk1/2 contribueixen tant a la inactivació de Cdc25 com a l'activació de p53 després de la detecció de dany al DNA. Així, l'activació dels *checkpoints* pels mecanisme dependents o independent de p53 tenen un origen comú. L'activitat ATM/ATR en la via independent de p53 pot ser inhibida amb dosis altes de cafeïna (2mM) (31), però en aquestes condicions les kinases ATM/ATR encara són capaces de mediar l'activació de p53 i la repressió de la Ciclina B (195). Calen dosis superiors (10mM) per reprimir totalment el promotor de la Ciclina B i inhibir totalment l'arrest en G2 en condicions de dany al DNA (66).

1.4 p53 i la reparació del DNA

p53 pot ser activat per diferents agents genotòxics com la radiació ionitzant, carcinògens químics i l'estrès oxidatiu, tot i que també pot ser induït per dany no genotòxic, com l'hipòxia i l'activació d'oncogens (301).

L'activació de p53 pels agents genotòxics està implicada amb el manteniment de l'estabilitat del genoma a través de la inducció de diferents respostes cel.lulars. En algunes cèl.lules, o en certes circumstàncies, l'activació de p53 desencadena apoptosi, mentre que en altres p53 té una funció protectora atribuïble no només al bloqueig del cicle cel.lular, sinó també a la pròpia inducció de la reparació del DNA (117,309).

S'han descrit més de 200 gens humans regulats per p53, encara que fins ara només s'han aïllar uns 57 promotors on p53 es pot unir específicament (371).

El sistema de reparació del DNA és crucial pel manteniment del genoma. Les alteracions al DNA per manca de reparació causen mutacions que incrementen el risc a patir càncer. La inestabilitat genòmica és una causa habitual dels processos metabòlics i de factors exògens com la dieta, l'estil de vida i la radiació solar. La reparació del DNA és un de les respostes principals amb que la cèl.lula afronta aquest tipus de dany, minimitzant les alteracions genètiques, per tant, les deficiències en els sistemes de reparació són uns dels factors que incrementen la carcinogènesi.

Entre els sistemes de reparació del DNA el sistema de reparació del DNA per escissió de nucleòtids (NER) és el mecanisme principal en eliminar la majoria dels artefactes al DNA com poden ser els dímers de pirimidina induïts per UV i els hidrocarburs aromàtics policíclics, proveïnt a la cèl.lula d'una barrera contra la neoplàsia, la mutagènesi i la citotoxicitat (329).

Un altre sistema de reparació és l'excisió de bases (BER). Aquest es creu que manté la integritat genòmica corregint les bases nitrogenades modificades que hi pot haver en el DNA (329). El dany a les bases pot ser generat per espècies reactives de l'oxigen (ROS) incloent l'ió superòxid, el radical hidroxil i el peròxid d'hidrògen. El sistema de reparació BER també és capaç de reparar l'alquilació de les bases nitrogenades que es dona a través d'agents alquilants endògens com la S-adenosilmetionina (SAM), i els llocs abàsics que sorgeixen espontàniament com a conseqüència de les fluctuacions de la temperatura o dels processos intermedis de la pròpia reparació del DNA (329).

Els sistemes de reparació NER i BER estan formats per complexos multiproteics formats per unes 20 proteïnes cadascun. En ambdós casos cal una primera incisió a la cadena danyada del DNA i una posterior resíntesi de la seqüència correcta basada en la cadena motllo complementària. En el sistema BER es refan fragments de 1 a 16 bases de llargada, mentre que en el sistema NER els fragments són d'unues 30 bases (110). La composició dels complexos multiproteics NER i BER difereixen en la major part de les proteïnes, però ambdós contenen la proteïna PCNA (proliferating cell nuclear antigen), la proteïna XP-G (xeroderma pigmentosus group G) i DNA polimerases (ϵ i δ per NER, i β per BER) (235).

S'ha suggerit que alguns gens implicats en els processos de reparació del DNA com; *gadd45 α* , *p48-xpe* i la *DNA polimerasa β* podrien ser dianes transcripcionals de p53.

Pel que fa al sistema NER el gen *gadd45 α* és induïble en condicions d'estrès i la seva proteïna codificant actua unint-se a la cromatina en els llocs danyats per l'UV, on és capaç d'interaccionar amb PCNA, amb les histones dels nucleosomes i amb p21^{Cip1} (347). A través d'aquestes interaccions es creu que Gadd45 α pot activar els mecanismes de reparació, ja que les cèl.lules deficientes per Gadd45 α no reparen eficientment el DNA i mostren una elevada sensibilitat a la radiació UV. Aquestes cèl.lules mostren un increment d'anormalitats cromosòmiques, suggerint que Gadd45 α contribueix al manteniment de la integritat del genoma.

La proteïna p48-XPE (xeroderma pigmentosum, grup E) del complex de NER també s'uneix al DNA danyat per radiació UV, i l'activació de p53 afecta la reparació del DNA a través de l'activació transcripcional de Gadd45 α i p48-XPE (156). Els pacients de xeroderma pigmentosum, grup E, presenten un fenotip clínic que inclou l'aparició de càncer de pell possiblement degut a la funció deficitària de NER i BER.

La possibilitat de la implicació de p53 en la reparació del DNA *in vivo* ve de les observacions on es mostra que p53 incrementa la reparació global del genoma. Malgrat tot, amb l'addició de p53 recombinant *in vitro* no s'aconsegueix un increment de l'activitat NER, però sí que incrementa l'activitat de la DNA polimerasa β del sistema BER (426). Confirmant aquesta activació les cèl.lules deficientes per p53 també mostren una activitat deficient de la DNA polimerasa β . A més, p53 és capaç d'interaccionar directament amb la DNA polimerasa β , suggerint un paper directe del supressor tumoral en aquest sistema de reparació.

1B Introducció a la regulació postranscripcional

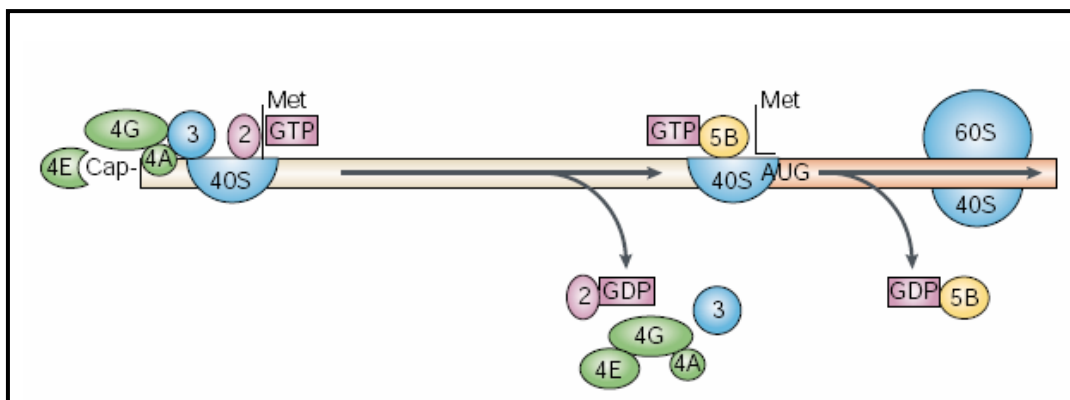
1.1 Regulació al 5'UTR de l'mRNA

Normalment l'mRNA està en excés al citoplasma i ha de competir per la maquinària de síntesi de proteïnes. Les estructures primàries i secundàries a les zones no traduïdes UTR (untranslated regions), 5'UTR i 3'UTR, afecten en gran mesura l'eficiència de la producció d'una determinada proteïna facilitant, en més o menys grau, l'accés a la maquinària de traducció.

Els primers passos en la unió de la maquinària al 5'UTR tenen lloc a la seqüència CAP (m7GpppN), al 5' de l'mRNA. Aquesta regió uneix el complex multiproteic d'unió a CAP format per diferents proteïnes entre les que es poden destacar una proteïna d'unió a la seqüència CAP (eIF4E), una RNA helicasa (eIF4A) i una subunitat amb funció estructural (eIF4G) (**Esquema 1**).

La unió del complex multiproteic d'unió a CAP facilita la unió de la subunitat 40S del ribosoma a través de la proteïna pont eIF4G (242).

Al mateix temps, el complex d'unió a CAP actua relaxant estructures secundàries de la regió 5'UTR, ajudant al ribosoma a passar a través d'aquestes estructures. Durant aquest trànsit, la subunitat ribosomal 40S forma un complex ternari amb GTP i el tRNA, carregat amb la primera metionina. Aquest complex, ara anomenat 43S, resegueix el 5'UTR fins trobar el primer codó AUG, que serà reconegut per l'anticodó del tRNA-Met (242). En aquest moment el GTP és hidrolitzat, els factors d'iniciació que formen el complex CAP són alliberats, i la subunitat 60S s'uneix a la subunitat 40S formant un nou complex 80S, anomenat monosoma, i començant el procés d'elongació (242).



Esquema 1. Complexes proteics reguladors de l'inici de la traducció al 5'UTR
(extret de Méndez R & Richter JD, 2001)

A la vegada hi ha reguladors positius o negatius que sovint faciliten o interfereixen l'ensamblatge del complex 43S amb l'mRNA, per formar el complex anomenat 48S. Alguns d'aquests factors negatius no solen discriminar entre els diferents mRNAs (ex; les eIF4E binding proteins, eIF4EBP) (120), i d'altres es poden unir, directa o indirectament, a seqüències específiques al 5' o al 3'UTR (ex: la proteïna Maskin) (357). Altres proteïnes d'unió al poli-A, (PABPs) actuen com a factors positius potenciant l'ensamblatge del complex 48S (365).

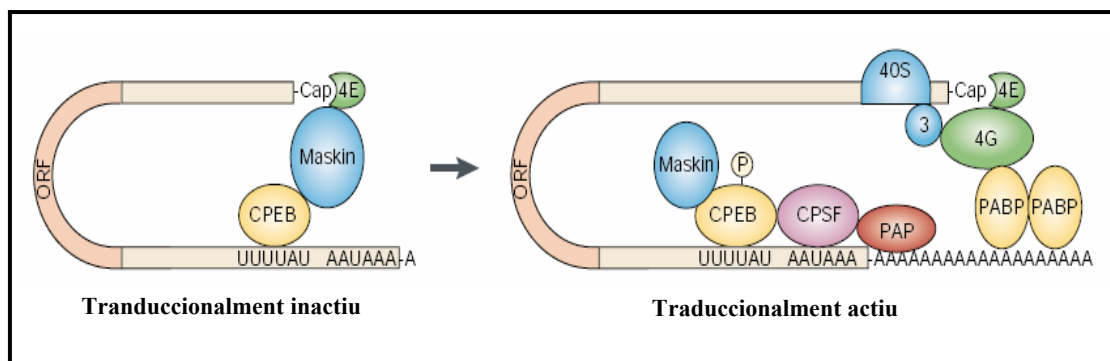
1.2 Regulació al 3'UTR de l'mRNA

Pel que fa a la regulació a través del 3'UTR, l'elongació de la cua poli-A a través del procés del poliadenilació, té a veure amb l'estabilitat de l'mRNA i amb la regulació de la traducció. (**Esquema 2**) La poliadenilació requereix dos elements en el 3'UTR; l'hexanucleòtid AAUAAA, i un element de poliadenilació citoplasmàtica (CPE), que sol ser de 20 a 30nt. Aquesta seqüència pot ser una mica variable, tot i que inclou seqüències consens del tipus UUUUAU (104,237). Així doncs, la poliadenilació estarà regulada per la seqüència precisa del CPE, pel número de còpies dels elements CPE i per la distància entre els CPE i l'hexanucleòtid (242). Precisament alguns mRNA, com el de la Ciclina B1, contenen diferents CPEs (131).

A la seqüència CPE s'hi uneix la proteïna d'unió a CPE (CPEB). Aquesta proteïna conté un motiu de reconeixement de l'RNA i un domini amb una estructura tipus "dit de zinc" d'unió a l'RNA altament conservats (358). S'ha vist que la fosforilació de CPEB (Ser174) en *Xenopus laevis* incrementa la seva afinitat pel factor de poliadenilació específic anomenat *Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor* (CPSF) (241). CPSF s'uneix a la seqüència AAUAAA, i aquesta unió es veu estabilitzada per CPEB, reclutant una poli-A-polimerasa (PAP) al final de l'mRNA (241).

Les cèl.lules somàtiques contenen diferents poli-A-polimerases. Una d'aquestes és una forma curta sense l'extrem C-ter on es situaria la seqüència de localització nuclear (NLS). Aquesta forma curta sembla ser l'única poli-A-polimerasa que catalitza la poliadenilació citoplasmàtica de l'mRNA (113).

Així doncs la proteïna CPEB pot afavorir la poliadenilació de l'mRNA segons el seu estat de fosforilació.



Esquema 2. Complexes proteics reguladors de l'inici de la traducció al 3'UTR
(extret de Méndez R & Richter JD, 2001)

La proteïna anomenada Maskin, capaç d'interaccionar simultàniament amb CPEB i eIF4E (357), sembla competir per la interacció entre eIF4E i eIF4G que ha de permetre o no la formació del complex 48S amb eIF4G (225). Així, la interacció de eIF4E amb Maskin regula la traducció negativament impeding la formació del complex 48S (242). La dissociació entre Maskin i eIF4E afavoreix el començament de la traducció i es dona, encara que de manera parcial, al mateix temps en que hi ha la poliadenilació (357).

Una segona via per la qual es creu que la poliadenilació pot induir la traducció és promovent la 2'-O-metilació del CAP (242). Les estructures m⁷GpppN del CAP, al 5' de l'mRNA, són usualment metilades en la base o en la ribosa. Com a conseqüència

de l'elongació de la cua poli-A, l'estructura del CAP és metilada en el primer i segon sucre immediatament després de l'enllaç trifosfat (200). La inhibició d'aquesta metilació s'ha vist que inhibeix la traducció, mentre que l'augment del grau de metilació augmenta la eficiència en la producció de la proteïna (199). La relació entre la poliadenilació i la metilació és del tot desconeguda, però en el virus *Vaccinia* és curiós veure que la poli-A-polimerasa té també activitat metil-transferasa (326).

En la regulació de la traducció a través del 3'UTR un altre element a tenir en compte són els AU-rich elements (ARE), descoberts en els gens d'algunes citoquines i proteïnes oncogèniques, encara que la llista dels mRNA que contenen aquests elements s'ha expandit des del seu descobriment, indicant que aquests elements estan presents en gens de funcions molt diverses (21).

Els ARE estan formats per un nombre variable de còpies del pentàmer AUUUA o del nonàmer UUAUUUAUU (21). Segons el número i la distribució del pentàmer AUUUA que contenen els ARE es poden classificar en tres classes. Els de la classe I contenen d'un a tres pentàmers distribuïts en una àmplia zona del 3'UTR que també conté regions riques en U. Els ARE de classe II tenen almenys dues còpies solapades del nonàmer UUAUUU(U/A) (U/A)U en un entorn ric en U. Els ARE de la classe III no contenen pentàmers ni nonàmers, però són rics en U.

Els tres tipus d'ARE poden conferir inestabilitat a l'mRNA en cèl·lules de cultiu a través de diferents mecanismes que impliquen deadenilació de l'mRNA (52). Tanmateix, les poques observacions que es tenen de la conducta fisiològica dels ARE indiquen hi ha diferències funcionals entre ells, ja que mentre els ARE de classe II són elements dominants d'inestabilitat, els ARE de classe I no semblen induir necessàriament inestabilitat al mRNA (205).

Fins avui, la importància fisiològica dels ARE *in vivo* evaluada en uns quants gens indica que els ARE han d'estar a la regió *downstream* de la regió codificant per ser funcionals, a la vegada que per exercir com a agents desestabilitzants és més important el seu contingut en UA que la seva localització exacta (196).

A través d'assajos de mobilitat electroforètica amb sondes de mRNA s'ha pogut identificar diferents proteïnes que interaccionen directa o indirectament amb les seqüències ARE. AU binding factor 1 (AUF1) va ser la primera proteïna identificada per aquest tipus d'unió, i es va aïllar per la capacitat d'induir la disminució dels nivells de l'mRNA de *c-Myc in vitro* (425). AUF1 mostra tenir una elevada afinitat per unir-se als ARE de classe I i II gràcies a dues regions centrals amb motius de reconeixement de RNA (RRMs), en combinació amb una zona N-ter rica en alanines i una regió C-ter rica en glutamines (408). AUF1 actua mitjançant la degradació de l'mRNA a través del reclutament de l'exosoma, un complex multimèric format per proteïnes d'unió a l'RNA i per exoribonucleases que actuen 3'-5' (51). Això suggereix que la funció de les proteïnes que s'uneixen a l'ARE està també condicionada pels complexos proteics en que s'integren, suggerint que no necessàriament s'han d'unir directament a l'mRNA (424).

1C Introducció a la regulació postraducciona

1.1 Degradació de les ciclines

En mamífers hi ha diverses ciclines de G1 que interaccionen amb diferents proteïnes Cdk per regular la transició de G1 a S (335). Cdk4 i Cdk6 s'associen a les ciclines del tipus D, (D1, D2 i D3) mentre que Cdk2 s'associa a la Ciclina E. Encara que les fluctuacions de les ciclines D són mínimes al llarg del cicle cel.lular en presència de mitògens (3), l'acumulació de la Ciclina E és molt evident a finals de G1 i decau durant la fase S (285).

Les ciclines de G1 de mamífers, i altres proteïnes relativament inestables, contenen una seqüència rica en Pro, Ser, Thr i aminoàcids acídics denominada PEST que intervé en la seva degradació a través del sistema ubiquitina/proteasoma (80). Tanmateix, tot i que les ciclines E no tenen un motiu PEST evident, presenten un residu (Thr380) que pot ser fosforilat facilitant el reconeixement i el processament a través del complex SCF i el sistema ubiquitina/proteasoma (189). Per contra, la degradació de les ciclines mitòtiques és a través d'una seqüència de destrucció, *destruction box* o *D-box*, d'uns 10-20 residus amb un motiu comú RXXL conservat i situat a l'extrem N-ter (121). A través d'aquesta seqüència la proteïna també serà degradada via ubiquitinació i degradació proteasomal a la fase M, però a diferència de les ciclines de G1 no es requereix la seqüència PEST ni el complex SCF.

1.2 Introducció a GSK3

La proteïna GSK3 és una serina/treonina kinasa que existeix en dues formes, α i β . Les dues formes estan expressades de manera constitutiva i ubiqua en els teixits de mamífers, manifestant una activitat involucrada en processos tan diversos com la regulació del metabolisme de la glucosa, la síntesi de proteïnes, la proliferació cel.lular, la dinàmica dels microtúbuls i la motilitat cel.lular. Fins avui s'han identificat unes 47 proteïnes substrat de GSK3, des de proteïnes estructurals, a enzims metabòlics i factors de transcripció (105,414).

L'activitat de GSK3 sobre un substrat requereix un residu prolina proper al residu serina/treonina fosforilable i sol estar dirigida per una fosforilació prèvia sobre el mateix substrat, denominada *priming site*. Aquesta primera fosforilació és deguda a l'activitat d'altres kinases i està situada quatre residus en direcció a l'extrem carboxil respecte el lloc de fosforilació de la GSK3. Així, la proteïna substrat resulta fosforilada per una kinasa variable al *priming site* i seguidament per la GSK3 en la seqüència consens [S/T-PXX-S/T(P)] (100). Quan el *priming site* és substituït artificialment per altres residus no fosforilables hi ha una pèrdua de l'activitat GSK3 sobre el substrat de fins a 100 vegades (9,82).

La inactivació de GSK3 es dona per l'activació de diferents vies metabòliques, que resulten en la fosforilació de la Ser 9 de GSK3 β (Ser21 en el cas de GSK3 α), desestabilitzant els complexos que GSK3 forma amb els seus substrats (414).

1.3 Regulació de l'estabilitat de la Ciclina D1 per GSK3

Durant la fase G1 les ciclines del tipus D (D1, D2 i D3) són sintetitzades en resposta a factors de creixement i s'uneixen a Cdk4 o Cdk6, generant holoenzims actius que ajuden a inactivar la funció supressora de creixement de pRb a través de la seva fosforilació (401). Els complexos amb ciclines D també són capaços de segrestar inhibidors de Cdk, com p27^{kip1} i p21^{cip1}, facilitant l'activació de Ciclina E-Cdk2 i la conseqüent entrada a la fase de síntesi del DNA (337).

Tant l'expressió de la Ciclina D1 com la seva unió a Cdk requereixen les activitats seqüencials de Raf, Mek1 i Mek2, i l'acció sostinguda de proteïnes kinases regulades per senyals extracel·lulars, les ERK (399). La degradació de la Ciclina D1 en resposta a la manca de senyals mitogèniques requereix la fosforilació a la Thr286 localitzada prop de l'extrem C-ter (84). Aquesta fosforilació està mediada per l'activitat de la kinasa GSK3 β , però és dóna preferentment quan el complex Cdk-Ciclina D1 és actiu. La kinasa GSK3 β sol actuar d'una manera seqüencial, requerint de prèvies fosforilacions per transferir els seus grups fosfat amb la màxima activitat. Així, no es pot descartar que l'activitat del propi complex Cdk-Ciclina D1 actui en un *priming site* de la pròpia ciclina.

En condicions d'estrès la funció de la GSK3 β sobre la Ciclina D1 és substituïda per la kinasa p38 SAPK2 (45). Aquesta serina/treonina kinasa forma part d'una família de proteïnes que s'indueix en condicions d'estrès i actua sobre el mateix residu que GSK3 β (Thr286), dirigint la degradació de la Ciclina D1 a través del proteasoma. Mentre que en condicions normals la degradació de la Ciclina D1 es dóna a través de la fosforilació per GSK3 β , aquest mecanisme no ha estat demostrat fins ara per la Ciclina D3 (44), i la seva degradació sembla estar regulada exclusivament per la kinasa p38 SAPK2 (364). Així, la degradació de la Ciclina D1 i D3 a través de p38 SAPK2 vincula la pèrdua d'aquestes proteïnes responsables del control d'inici de la fase G1 amb l'aturada del cicle cel·lular que es dóna en condicions d'estrès o dany cel·lular.

1.4 Regulació de la síntesi i l'estabilitat de la Ciclina D1 per Ras

La via Ras-Raf1-MEK-ERK regula la síntesi de la Ciclina D1 i la seva unió amb Cdk4 (59,399). A la vegada, Ras també pot actuar estabilitzant la Ciclina D1 a través de la inhibició de l'activitat de GSK3 β . En concret, Ras i la PI3K (fosfatidilinositol-3OH kinasa) col·laboren per activar el proto-oncogen Akt (106), i aquest, pot fosforilar i inhibir la GSK3 β (74,88) aturant el procés de degradació de la Ciclina D1.

La senyalització de Ras depèn de l'estimulació per factors de creixement, i això fa que l'equilibri entre síntesi i degradació de la Ciclina D1 es vegi influenciat per l'estimulació de les cèl·lules amb sèrum. Així, l'addició de sèrum a les cèl·lules provoca una disminució de l'activitat de GSK3 β i un increment de la vida mitjana de la Ciclina D1. Seguint la mateixa via, la sobreexpressió d'Akt afavoreix l'augment de la vida mitjana de la Ciclina D1 i l'ús de wortmanina, un inhibidor específic de la PI3K (372), la redueix (82).

1.5 Translocació nucleo-citoplasmàtica de la Ciclina D1 per GSK3

La distribució de les ciclines D varia en funció del cicle cel.lular. La Ciclina D1 s'acumula al nucli durant la fase G1, però durant la progressió de la fase S es va incrementant la proporció de d'aquesta proteïna al citoplasma, on és degradada (22). Curiosament, la Ciclina D1 no té cap seqüència que semblant a una NES canònica per tant, hi ha d'haver altres proteïnes que dirigèixin la seva localització nuclear.

La localització de Cdk4 coincideix amb el marcatge nuclear de la Ciclina D1 (83), però si al mateix temps s'expressa la kinasa GSK3 β la localització de la Ciclina D1 és majoritàriament citoplasmàtica (82). Per contra, l'expressió d'un mutant de GSK3 β sense activitat kinasa no afecta a la localització de la Ciclina D1, i el mateix passa amb el mutant Ala286 en substitució de la Thr286 de la Ciclina D1 (aquest mutant no actua com a dominant negatiu aturant el cicle cel.lular) (82). En conjunt, aquestes dades suggereixen l'existència d'una regulació de l'export nuclear de la Ciclina D1 per part de GSK3 β .

Aquesta kinasa és bàsicament una proteïna citoplasmàtica, però regula l'export nuclear de proteïnes com NFAT per una fosforilació directa (24), i per tant, hi ha d'haver una proporció de GSK3 β que ha de ser nuclear (82). Un estudi en detall de la localització d'aquesta kinasa ha demostrat que durant la fase G1 és exclusivament citoplasmàtica amb una tinció predominantment perinuclear, però durant la fase S un 25% de GSK3 β es detecta al nucli, fent possible la fosforilació de Ciclina D1 i el conseqüent export al citoplasma, on té lloc la proteòlisi via el complex del proteasoma 26S dependent d'ubiquitina (82).

1.6 Degradació proteasomal per poli-ubiquitinació

La degradació proteica a través del sistema ubiquitina/proteasoma és un procés multiseqüencial que regula una gran varietat de funcions cel.lulars a més del cicle cel.lular (140,146,266). La formació dels conjugats de poli-ubiquitines sobre una proteïna substrat que després serà reconeguda i destruïda pel proteasoma 26S implica tres components que participen en una cascada de reaccions de transferència de la ubiquitina: un enzim activador de la ubiquitina (E1), un enzim que conjuga la ubiquitina (E2) i un factor d'especificitat (E3) anomenat lligasa d'ubiquitina (141).

La família de proteïnes E2 regula la conjugació d'ubiquitines mitjançant la formació d'un enllaç isopeptídic entre el C-ter de la glicina de la ubiquitina i residus específics de lisina en la proteïna substrat. La ubiquitina també es pot conjugar a ella mateixa pels seus propis residus lisina, formant cadenes de poli-ubiquitines (49).

En alguns casos, la conjugació d'ubiquitines a proteïnes substrat també requereix d'enzims de la família E3 o ubiquitin-lligases. Aquests enzims poden actuar amb diferents combinacions d'E1 i E2, regulant l'especificitat de la proteïna a ser degradada (188,331). Actualment hi ha un interès creixent en la determinació dels enzims E3, ja que tenen una gran importància en el control de l'abundància de certes proteïnes. Malgrat aquest interès creixent, encara són poques les proteïnes que tenen un enzim E3 assignat.

1.7 Regulació de l'estabilitat de la Ciclina E a través de Cdk2, GSK3 i Fbw7

La Ciclina E té una expressió màxima a finals de G1 i regula la progressió cap a S unint i activant Cdk2, mentre que els seus nivells són molt baixos a la fase M i al començament de la fase G1 (334). La regulació del cycle cel.lular ha de ser molt estricta pel que fa al control de l'acumulació de Ciclina E i l'activació del complex Ciclina E-Cdk2, ja que la sobreexpressió de la Ciclina E i l'acumulació del seu complex causen una transició de G1 a S prematura i un retard en la progressió a través de la fase S que es tradueix en una inestabilitat genòmica freqüent en molts tipus de tumors (312,353).

El tractament de les cèl.lules amb el pèptid aldehid N-acetil leucinil leucinil norleucinal-H (LLnL), un potent inhibidor de l'activitat quimioproteasomàtica que trenca la partícula 20S del complex proteasomal (388), provoca l'increment dels nivells de Ciclina E, indicant que la degradació d'aquesta ciclina és a través del proteasoma (411). La Ciclina E pot seguir dues vies de proteòlisi dependent d'ubiquitina. Una d'aquestes vies promou la degradació de la Ciclina E lliure a través de la ubiquitina lligasa Cul-3 (68,342). En canvi, quan la Ciclina E està unida a Cdk2 està subjecte a la fosforilació en determinats residus que la fan sensible al reconeixement per la ubiquitina lligasa Fbw7 (189). Aquesta és una de les subunitats E3 de la família SCF que reconeixen substrats específicament fosforilats prèvia a la ubiquitinació (97,345). Existeixen tres isoformes de Fbw7 (α , β i γ) i totes actuen igual sobre la estabilitat de la Ciclina E unida a Cdk2, però no afecten a d'altres ciclins, com la Ciclina A, ni a la Ciclina E lliure o no fosforilada (402). Amb experiments de fosforilació, tripsinització i seqüenciació s'ha vist que els residus fosforilats majoritàriament en Ciclina E són S372, T380 i S384. La fosforilació al residu S384 depèn de l'activitat de Cdk2, potser a través d'un procés d'autofosforilació, ja que pot ser abolida amb l'ús de p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, roscovitina o d'un dominant negatiu de Cdk2 fent que Fbw no tingui cap efecte sobre l'estabilitat de la Ciclina E. En canvi, les fosforilacions als residus S372 i T380 no es veuen afectades per la inhibició de Cdk2 (402).

Com que la fosforilació de T380 *in vivo* no depèn de Cdk2, es va pensar en GSK3 β com a candidat. Com s'ha dit, aquesta kinasa regula l'estabilitat d'altres ciclins i requereix d'una prolina a la seva seqüència consens i d'una fosforilació prèvia a la posició +4 per ser plenament activa (82). La T380 té una prolina a la posició +1, i a la posició +4 hi ha la S384 fosforilada per Cdk2, fet que podria millorar l'eficiència de la fosforilació per GSK3 β com a *priming site*. Així, es comprovà que efectivament GSK3 β pot fosforilar el residu T380 de la Ciclina E, tot i que sembla un fenomen independent de la fosforilació a S384 per Cdk2. Per tant, el turnover de la Ciclina E a través de Fbw7 està regulat per l'activitat de Cdk2 a S384 i de GSK3 β a T380 de manera independent, encara que també hi poden intervenir altres kinases a través del residu S372 (402).

Finalment, en tumors de mama on es detecta un increment de la Ciclina E s'ha observat que els nivells del mRNA de Fbw7 són més baixos (189). A la vegada, a la zona cromosòmica on es localitza Fbw7 (4q32) s'hi ha determinat una pèrdua d'heterozigotitat significativa en diferents càncers, el que configura la proteïna Fbw7 com a supressor tumoral (185). Tot i l'elevada especificitat d'aquesta ubiquitina lligasa s'han identificat diferents enzims E3 capaços de regular els nivells de la Ciclina E, possiblement integrant diferents senyals amb capacitat per regular els nivells totals d'aquesta proteïna.

1.8 Regulació de l'activació de p53 per GSK3

L'estrès cel·lular, com per exemple el tractament amb radiacions ionitzants, comporten l'activació de p53. Aquesta proteïna és rescatada de la degradació i s'acumula a nivells elevats que permeten l'activació de la transcripció de determinats gens diana en aquestes condicions.

El mecanisme que porta a l'estabilització de p53 encara no ha estat del tot caracteritzat, però alguns estudis suggereixen que la disrupció del complex format per p53 i el seu regulador negatiu, Mdm2, és dona a través de la defosforilació del domini central de Mdm2, ja que després d'irradiar hi ha una hipofosforilació de Mdm2 (32,50,144). En condicions normals la proteïna Mdm2 evita la interacció de p53 amb altres factors de la maquinària de transcripció i media la degradació de p53 a través del proteasoma (150). Mdm2 té diferents activitats que són necessàries per la degradació de p53: s'uneix a p53 a través del seu domini N-ter i conjuga ubiquitina a les Lys del domini C-ter de p53 a través de l'activitat ubiquitina lligasa de té el seu domini C-ter. Una vegada p53 està completament ubiquitinada, una funció postubiquitinació de Mdm2 encara desconeguda s'encarrega de la degradació de p53 a través del proteasoma.

La degradació eficient de p53 requereix la fosforilació de diferents residus contigus en el domini central de Mdm2 (posicions 220-260). En condicions normals aquest domini està altament fosforilat, i la mutació d'aquest residu a Ala interfereix amb la degradació de p53 (32). Recentment s'ha identificat a la Casein Kinasa I delta (CKI δ) com a la kinasa que fosforila Mdm2 al seu domini central, Ser244 (410), però a més d'aquesta fosforilació hi ha dos llocs consens per a la fosforilació per la GSK3 β .

Algunes evidències com l'existència de llocs consens per la fosforilació de GSK3 β al domini central de Mdm2, la interacció física entre GSK3 β i Mdm2 i la inactivació de GSK3 β després de tractaments amb radiació ionitzant corroboren la disminució de la fosforilació per GSK3 β al domini central de Mdm2 afavorint l'acumulació de p53. Així, tot indica que la funció postubiquitinació de Mdm2 podria estar mediada per GSK3 β (202).

2A Resultats de la regulació transcripcional de la Ciclina O

2.1 Regulació positiva de l'expressió de la Ciclina O per ATM/ATR i p53 *in vivo*

En els timòcits provinents del timus els nivells de l'mRNA de la Ciclina O s'indueixen espontàniament durant la disgregació del teixit. Després d'aquesta primera inducció sembla haver-hi un efecte refractari que impedeix estudiar l'expressió d'aquest gen en tractaments posteriors (veure **Capítol 4, apartat 2.1**).

Actualment, encara no disposem dels mitjans per detectar els nivells baixos de la proteïna Ciclina O endògena present en els cultius cel·lulars, però malgrat aquesta dificultat, el cultiu de cèl·lules MEF ofereix un sistema que permet l'estudi del seu mRNA. D'entre les línies cel·lulars testades al laboratori les cèl·lules MEF primàries (passatge 3-8) mostren expressió basal de la Ciclina O endògena, encara que a uns nivells molt baixos i comparables als observats en timus. Aquest fet, juntament amb la funcionalitat de p53 i la facilitat en l'obtenció i la manipulació han estat determinants a l'hora d'escollir aquest cultiu cel·lular primari com a model per l'estudi de la regulació transcripcional de la Ciclina O.

Les cèl·lules MEF són un sistema cel·lular menys sensible que els timòcits a la mort espontània en cultiu, i a diferència d'aquests, no tenen una resposta apoptòtica ràpida després de la inducció de p53 per dany al DNA. En les cèl·lules MEF, la radiació gamma i l'activació de p53 indueixen l'expressió de p21^{Cip1} causant un bloqueig en G1 seguit d'un increment de l'apoptosi a temps més llargs (198). Tanmateix, la deficiència de p21^{Cip1} en aquestes condicions provoca una ràpida resposta apoptòtica, consistent amb la integritat i funcionalitat de la maquinària apoptòtica latent en les cèl·lules WT (330).

Així doncs, per estudiar millor la correlació entre l'increment de l'apoptosi i de l'activitat de Cdk2 descrita en timòcits s'ha volgut determinar si la Ciclina O pot estar formant part de la maquinària apoptòtica de les cèl·lules MEF irradiades.

Mentre l'expressió basal de la Ciclina O en les cèl·lules MEF en cultiu es molt baixa, i en certes ocasions fins i tot indetectable, el tractament amb radiació gamma (10Gy) indueix un increment ràpid i transitori en els nivells de l'mRNA de la Ciclina O, de fins a 20 vegades respecte els nivells basals (**Figura 1 A**).

Hi ha estímuls apoptòtics, com el tractament amb glucocorticoides, que indueixen l'apoptosi de timòcits dependent de Cdk2 a través de mecanismes independents de p53 (119,126). Per contra, la radiació gamma en timòcits activa clarament p53 a través de la fosforilació a la Ser15 (resultat no mostrat) al mateix temps que s'indueix l'apoptosi dependent de l'activació de Cdk2. Aquests resultats suggereixen la participació de diferents mecanismes capaços d'activar Cdk2, encara que en ambdós estímuls es requereix la síntesi d'mRNA i de proteïnes *de novo*, i possiblement també la participació de la Ciclina O en l'activació de Cdk2.

Tot i que l'activació de p53 és necessària per l'apoptosi dels timòcits induïda per irradiació, encara es té poca informació sobre la seva activitat proapoptòtica en timòcits. L'expressió dels membres proapoptòtics de la família Bcl2; Bax, Puma, Noxa i Bid, està regulada per p53 i semblen tenir un paper important en els fenòmens apoptòtics mitocondrials en timòcits (250,270,282,325). Malgrat aquesta resposta proapoptòtica de p53 l'activació de Cdk2 en l'apoptosi per irradiació és l'event més apical de la via, *upstream* de la participació mitocondrial, i és dependent de la síntesi *de novo* de mRNA i de proteïnes, i de l'activació de p53 (126). Aquestes dades suggereixen la participació

de la funció transcripcional de p53 a diferents nivells de la via, i en concret en l'activació de Cdk2.

Per determinar si l'activació del factor de transcripció p53 és necessari per l'increment dels nivells d'mRNA de la Ciclina O en condicions d'irradiació es van obtenir cèl.lules MEF provinents de ratolins deficientes per p53. Els experiments d'irradiació duts a terme amb aquestes cèl.lules ens indiquen que la presència i activació de p53 per irradiació és necessària per la inducció de la Ciclina O en condicions de dany al DNA (**Figura 1 A**).

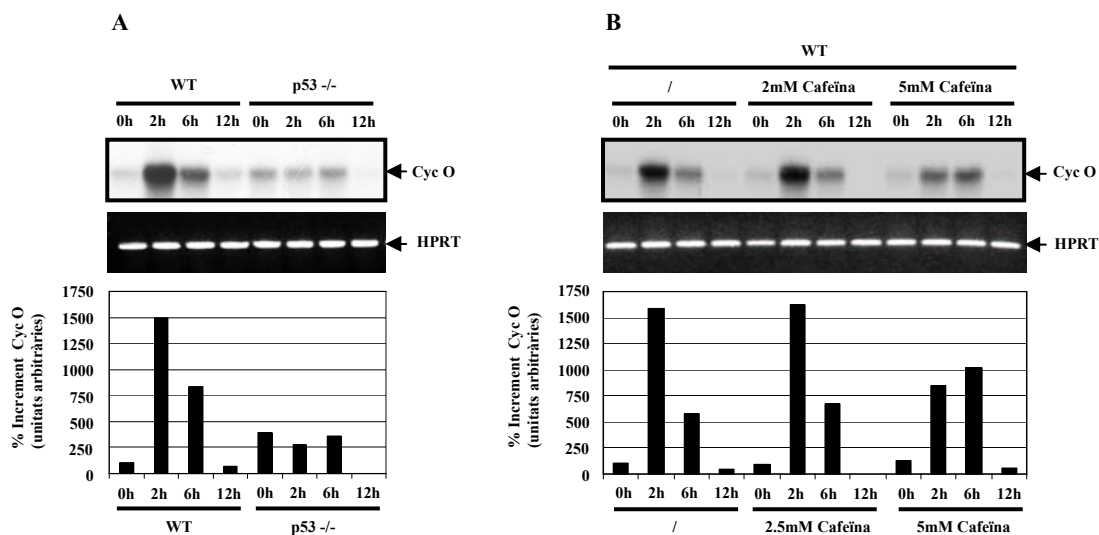


Figura 1. Inducció de l'expressió de la Ciclina O per radiació dependent de p53. En condicions normals les cèl.lules MEF expressen uns nivells baixos de la Ciclina O (0h). Després d'irradiació (10Gy) hi ha una inducció ràpida i transitòria de l'expressió de la Ciclina O que només es dona en presència de p53 (**A**). En presència de 5mM de cafeïna s'inhibeix parcialment la inducció de la Ciclina O (**B**). (el 100% d'expressió fa referència a l'expressió basal a 0h de les MEF WT).

La radiació causa múltiples lesions al DNA que poden ser detectades per proteïnes sensores (complex MRN) sensibles al dany al DNA (93). Aquestes proteïnes sensores senyalitzaran als factors més apicals de la maquinària cel.lular capaç d'induir una resposta cel.lular en condicions de dany genotòxic, les kinases ATM i ATR. Aquestes kinases són activades per fosforilació just després del dany al DNA i a la vegada fosforilen un seguit de substrats que intervenen en la reparació del DNA i en els *checkpoints* del cycle cel.lular, entre els quals hi ha les kinases Chk1/2 i p53. La fosforilació de p53 a la Ser15 comporta la seva activació transcripcional i l'expressió d'una bateria de gens implicats en la resposta cel.lular (186), entre els quals sembla haver-hi la Ciclina O.

Per determinar si ATM/ATR són les kinases apicals responsables de la inducció de la Ciclina O a través de la fosforilació i activació de p53 s'ha tractat les cèl.lules MEF irradiades (10Gy) amb diferents concentracions d'un inhibidor d'aquestes kinases, la cafeïna (2 i 5mM). El tractament de les cèl.lules MEF irradiades amb 2mM de cafeïna no afecta a la inducció de l'expressió gènica de la Ciclina O. Tanmateix, l'increment de la dosi a 5mM de cafeïna redueix en un 50% l'expressió màxima de l'mRNA de la Ciclina O induïda per radiació (**Figura 1 B**).

2.2 Baixa expressió de la Ciclina O en teixits adults

L'activitat transcripcional de p53 en embrions decau a partir del dia 13 de gestació en la major part de teixits, i es manté en regions molt concretes del sistema nerviós central i en grups reduïts de cèl·lules de la melsa, el timus, els ossos i la pell (veure **Capítol 9, apartat 1.1**). Així, p53 i la seva activitat es mantenen a uns nivells molt baixos a partir de les etapes més tardanes del desenvolupament i durant la vida de l'animal adult. Malgrat aquests nivells basals en condicions normals, la inducció de dany cel·lular i apoptosi a través d'una gran varietat d'estímuls causa un increment sobtat de l'activitat de p53 en molts teixits, especialment en el timus, la melsa i l'intestí prim.

Per estudiar correlació entre l'actitat de p53 i de la Ciclina O *in vivo*, així com la implicació de la Ciclina O en la mort cel·lular programada de l'embrió i en l'apoptosi de l'animal adult, s'ha determinat el patró d'expressió d'aquesta proteïna en diferents etapes del desenvolupament embrionari de ratolí (veure **Capítol 9, apartat 2**) i els nivells d'mRNA en diferents teixits d'animals adults (3-4 mesos d'edat). El patró d'expressió de la Ciclina O en l'animal adult s'ha obtingut mitjançant RT-PCR a partir de l'RNA total d'una bateria de teixits en condicions normals (**Figura 2**). En aquestes condicions l'expressió de la Ciclina O és indetectable en la major part de teixits estudiats, mentre que hi ha uns nivells d'mRNA creixents en cervell, pulmó i testicle, respectivament.

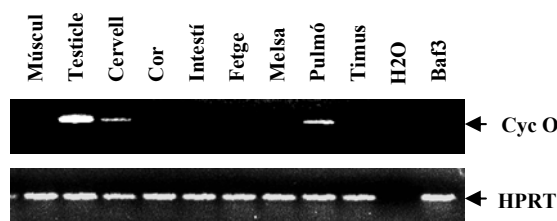


Figura 2. Expressió de la Ciclina O en diferents teixits de ratolí. Anàlisi dels nivells de mRNA mitjançant RT-PCR a partir de RNA total de diferents teixits de ratolí. Baf3 fa referència a una línia cel·lular de limfòcits-B de ratolí a partir de la qual s'han originat clons induïbles per a la sobreexpressió de la Ciclina O. Com a control de possibles falsos positius per contaminació s'ha utilitzat H2O enlloc d'RNA.

Els nivells de l'mRNA de la Ciclina O són propers al límit de detecció per RT-PCR en la majoria de teixits, però mostren un patró invariable en diferents experiments on s'ha utilitzat RNA provinent d'extraccions de teixits independents. Malgrat aquesta fiabilitat experimental, l'ús de reactius més sensibles fa possible la detecció de nivells d'expressió basals de la Ciclina O, almenys en el timus i els timòcits (veure **Capítol 4, apartat 2.1**), suggerint l'existència de nivells baixos de la Ciclina O també en d'altres teixits mostrats aquí com a negatius.

2B Resultats de la regulació postranscripcional de la Ciclina O

2.1 Regulació negativa de l'mRNA de la Ciclina O

En el cultiu primari de timòcits s'ha demostrat que l'apoptosi i l'activació de Cdk2 induïdes per radiació gamma són fenòmens dependents de la síntesi de RNA i de proteïnes, de manera que si la Ciclina O du a terme la funció proapoptòtica d'activació de Cdk2 probablement només sigui sintetitzada en condicions de dany cel.lular. Confirmant aquesta hipòtesi, les cèl.lules MEF tenen uns nivells d'expressió de la Ciclina O basals molt baixos i similars als nivells observats al timus, i al igual que en timus (veure **Capítol 4, apartat 2.2**) la irradiació (10Gy) provoca un increment sobtat dels nivells de l'mRNA de la Ciclina O. Després d'aquest increment, l'mRNA de la Ciclina O es degrada amb una vida mitjana d'unes 4h. Aquests resultats suggereixen un augment de la transcripció del gen *ciclina O* en condicions d'irradiació i l'existència d'un mecanisme de degradació constitutiu que permet mantenir i recuperar ràpidament els nivells basals d'aquest transcrit després del dany cel.lular.

Per confirmar que l'increment de l'mRNA de la Ciclina O després d'irradiació es deu principalment a un augment de la transcripció gènica s'ha tractat les cèl.lules MEF amb un inhibidor de la síntesi de RNA (actinomicina D, ActD). Com era d'esperar, la presència d'ActD impedeix detectar els baixos nivells endògens i també la inducció de l'mRNA de la Ciclina O després del tractament amb radiació gamma (**Figura 3 A**). A la vegada, per demostrar l'existència d'una expressió basal del gen *ciclina O* i d'un sistema constitutiu de regulació negativa d'aquest transcrit s'ha tractat les cèl.lules MEF amb inhibidor de la síntesi de proteïnes (cicloheximida, CHX). Contràriament al tractament amb ActD, la presència de CHX provoca l'acumulació de l'mRNA de la Ciclina O al llarg del temps, independentment de la inducció de l'apoptosi per irradiació (**Figura 3 B**).

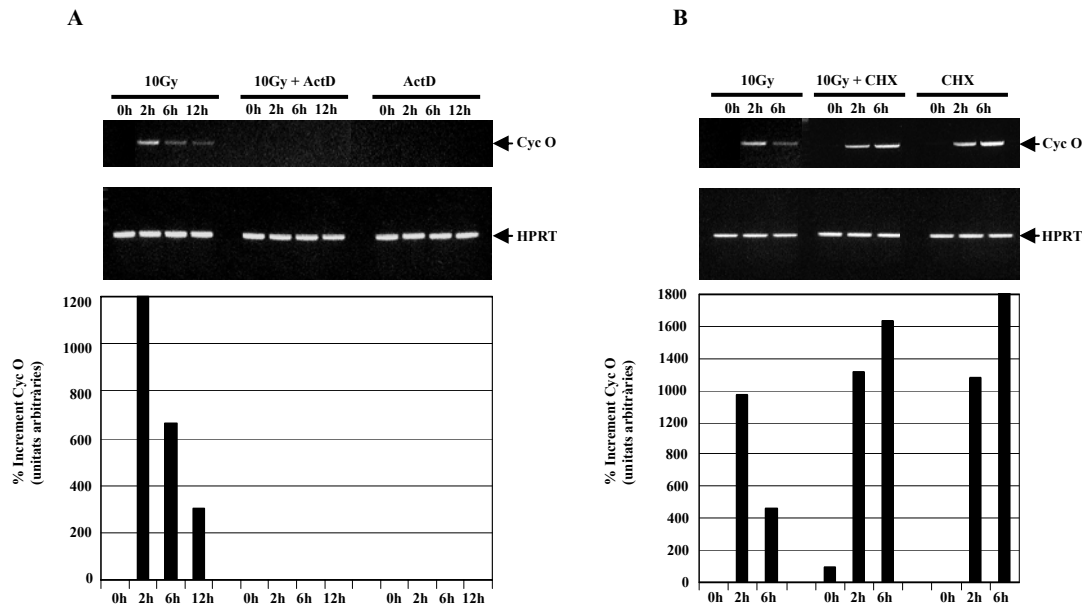


Figura 3. Estabilització dels nivells de l'mRNA de la Cyclina O en cèl.lules MEF en absència de la síntesi de proteïnes *de novo*. Anàlisi semiquantitativa, per RT-PCR, dels nivells de mRNA de la Cyclina O en absència de la síntesi de RNA *de novo* (ActD, 5µg/ml) en condicions normals o després de la inducció de la Cyclina O per irradiació (10Gy) (A). Anàlisi semiquantitativa, per RT-PCR, dels nivells de mRNA de la Cyclina O en absència de la síntesi de proteïnes *de novo* (CHX, 30 µg/ml) en condicions normals o després de la inducció de la Cyclina O per irradiació (10Gy) (B). (el 100% d'expressió fa referència als nivells de l'mRNA de la Cyclina O en l'expressió basal a 0h de les cèl.lules MEF WT, en cas que es detecti).

2C Resultats de la regulació postranscripcional de la Ciclina O

2.1 Autofosforilació de la Ciclina O i fosforilació per GSK3 β

Com s'ha vist anteriorment (veure **Capítol 2, apartat 1.1 i 1.4**) la Ciclina O és capaç d'activar la kinasa Cdk2 *in vitro* i *in vivo*, i la seva sobreexpressió sembla alterar la progressió del cicle cel.lular en línies cel.lulars originalment deficientes per aquesta proteïna (veure **Capítol 2, apartat 1.4**). Aquests resultats suggereixen que l'expressió de la Ciclina O en condicions d'apoptosi podria alterar el cicle cel.lular i/o que l'activitat de la Ciclina O podria estar regulada en funció de la fase del cicle en que es troba la cèl.lula. Tenint en compte que aquestes dades provenen de clons cel.lulars que sobreexpressen la Ciclina O de manera induïble, on s'ha comprovat que la síntesi induïda del mRNA és constant al llarg del cicle cel.lular, el més probable és que les diferents fases del cicle cel.lular actuïn regulant l'activitat de la Ciclina O a nivell postraduccional.

Per estudiar la regulació postraduccional de la Ciclina O, primerament s'ha volgut determinar l'origen del patró en doble banda que mostra la Ciclina O en els assajos de *western blotting*. Mentre en un lisat total la Ciclina O sobreexpressada mostra un patró de doble banda, el tractament del lisat amb fosfatasa alcalina (CIAP) causa la desaparició de la banda de major pes molecular (**Figura 4 A**). El mateix tractament en presència d'inhibidors de fosfatases impedeix aquest efecte, indicant que la desaparició de la banda d'elevat pes molecular és una acció específica de la CIAP sobre un o més grups fosfat de la Ciclina O responsables de la migració electroforètica més lenta. L'activitat kinasa associada i l'activitat kinasa d'autofosforilació no es veuen afectades pel tractament del lisat amb la CIAP, per tant l'activitat específica de la kinasa associada a la Ciclina O no depèn directament del seu estat de fosforilació. Per assegurar que l'acció de les kinases sobre la Ciclina O no està limitada per la concentració de riboadenosinatriphosfat (ATP) al lisat cel.lular, s'ha estudiat l'estat de fosforilació després de l'addició d'ATP. En aquestes condicions no s'indueix una major fosforilació de la Ciclina O, indicant que l'ATP no és limitant.

La kinasa GSK3 β s'ha descrit com una kinasa capaç de regular l'estabilitat de la Ciclina D1 i la Ciclina E, afavorint la degradació pel sistema proteasomal (82,402). Com es pot observar, GSK3 β també pot fosforilar la proteïna recombinant GST-Ciclina O probablement a la seqüència consens per GSK3 β (Ser63) (**Figura 4 B**). La Ciclina D3, igual que la Ciclina D1 i la Ciclina O, també conté una seqüència consens i és fosforilada per GSK3 β . Com a control negatiu la proteïna verda fluorescent GST-GFP no pot ser fosforilada per GSK3 β , indicant que la fosforilació de GSK3 β no es dona sobre la proteïna de fusió GST (glutatió-S-transferasa).

En aquests experiment les proteïnes recombinants usades han estat purificades a partir d'un extracte bacterià (veure **III Materials i Mètodes Generals, apartats 15 i 16**). En aquestes condicions la proteïna recombinant purificada està en una forma lliure, no forma part de complexos multiproteics, i presumiblement no ha estat modificada postraduccionalment per fosforilació.

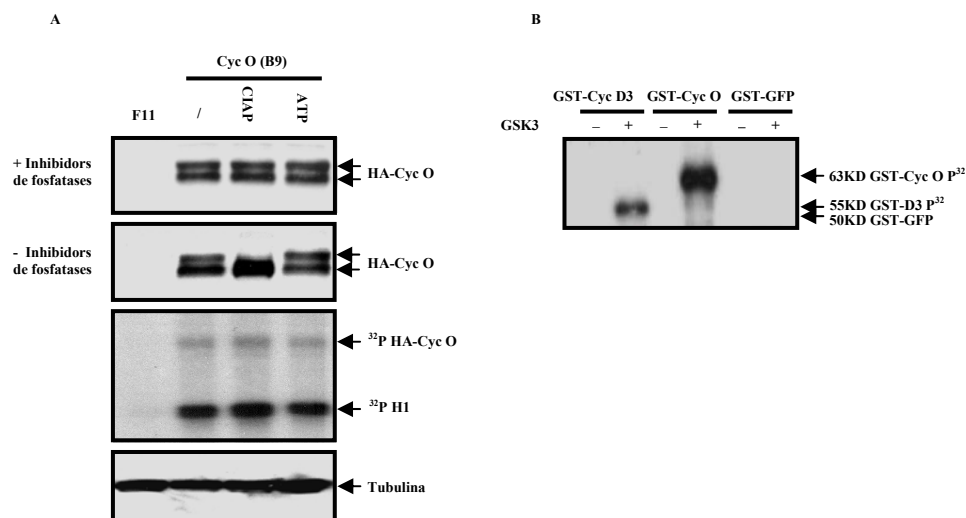


Figura 4. Determinació de la fosforilació sobre la Ciclina O. En condicions normals la Ciclina O (Cyc O) es detecta en forma de doblet per *western blotting*. La banda de més pes molecular disminueix la mobilitat electroforètica després del tractament amb la fosfatasa alcalina intestinal de vedella (CIAP). L'activitat kinasa associada de la Ciclina O no es veu alterada per les diferents formes de fosforilació de la proteïna (A). La kinasa GSK3 β pot fosforilar la Ciclina D3 i la Ciclina O *in vitro* (B). (B9 és un clon positiu per l'expressió induïble de la Ciclina O, F11 és un clon control)

2.2 Estabilització de la Ciclina O per GSK3 β

La fosforilació de GSK3 β disminueix l'activitat dels complexos formats per les ciclines D1 i E afavorint la degradació d'aquestes proteïnes pel proteasoma (82,402). Per comprovar si la fosforilació d'aquesta kinasa sobre la Ciclina O observada *in vitro* pot tenir un efecte sobre l'activitat dels seus complexos *in vivo* s'ha avaluat la vida mitjana de la Ciclina O i la seva activitat kinasa associada en presència de LiCl, un inhibidor de GSK3 (184,355).

Durant 12h s'ha induït l'expressió de la Ciclina O exògena en un sistema tetON amb doxiciclina (DOX). A les 12h d'inducció s'aconsegueixen uns nivells elevats de la Ciclina O induïda i s'atura la seva síntesi amb un rentat de les cèl.lules per tal d'eliminar la DOX del medi i al cultiu s'afegeix medi nou amb cicloheximida (CHX) per tal d'inhibir la síntesi proteica. Durant les 12h següents s'han determinat els nivells i l'activitat kinasa associada de la Ciclina O (**Figura 5 A**). En aquestes condicions la vida mitjana dels nivells de la Ciclina O i de la seva activitat és d'unes 5h, i s'observa una degradació preferencial de la forma fosforilada de la proteïna.

Quan el medi nou conté CHX i LiCl els nivells de la Ciclina O i la seva activitat associada són molt més estables, indicant que la inhibició de l'activitat GSK3 sobre la Ciclina O té un efecte estabilitzador similar a l'observat en les altres ciclins (**Figura 5 B**). Tot i que el LiCl és una molècula petita i fàcilment permeable a la cèl.lula, hi ha una devallada inicial de Ciclina O (de 0h a 2h) causada probablement pel temps necessari per que comenci l'acció del LiCl.

L'efecte estabilitzador també s'aconsegueix amb el tractament amb roscovitina, un inhibidor de l'activitat Cdk2 (239), o amb Cbz-LLnL, un inhibidor del proteasoma (388). Tanmateix, en aquests casos l'ús dels inhibidors altera la viabilitat cel.lular implicant una valoració acurada de la vida mitja (resultats no mostrats).

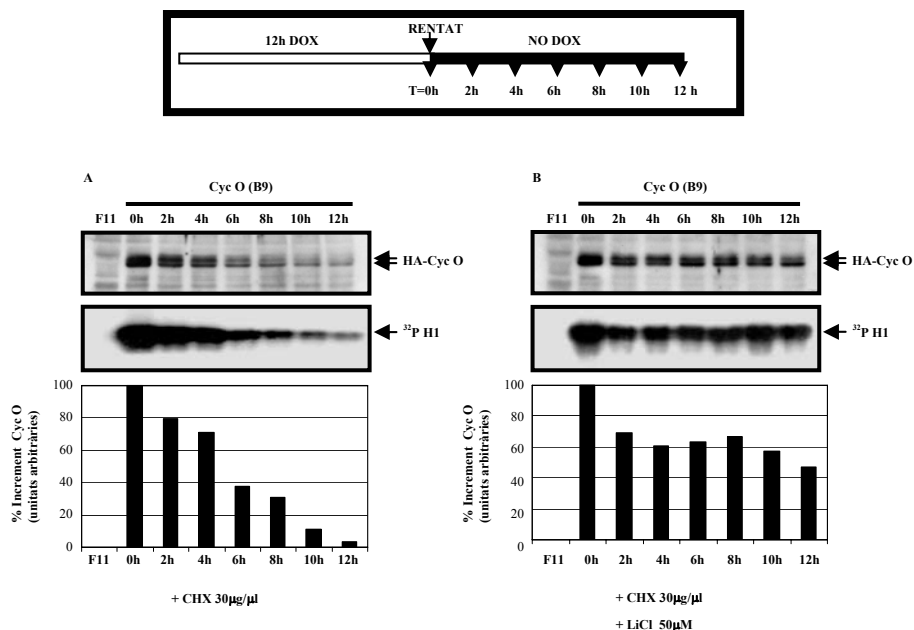


Figura 5. Degradació de la Ciclina O mediada per l'activitat kinasa de GSK3 β . Després de la inducció de la Ciclina O durant 12h amb doxiciclina (DOX) s'elimina la doxiciclina del medi i s'atura la traducció proteica afegint cicloheximida (CHX). En aquestes condicions la Ciclina O (Cyc O) acumulada és degradada amb un temps de vida mitja de 5h i l'activitat kinasa associada sobre la Histona H1 decau amb una cinètica similar (A). En presència de LiCl, inhibidor de GSK3, hi ha una estabilització de la Ciclina O i es manté la seva activitat kinasa associada (B). (el 100% d'increment de la Ciclina O fa referència als nivells de partida acumulats després de 12h d'inducció; B9 és un clon positiu per l'expressió induïble de la Ciclina O i F11 és un clon control).

2.3 Fluctuació de l'estabilitat i l'activitat de la Ciclina O durant el cycle cel.lular

D'entre els membres de la família de les ciclins, aquells que tenen a veure amb la regulació del cycle cel.lular tenen un comportament cíclic i s'indueixen, o s'estabilitzen, en aquella fase del cycle cel.lular en que desenvolupen la seva funció. En les fases del cycle en que no intervenen el seu gen es deixa d'expressar i la proteïna es degrada recuperant uns nivells basals molt baixos o indetectables (121,188,266). Aquest tipus de regulació durant el cycle cel.lular ha donat el nom a aquesta família de proteïnes, malgrat que alguns dels seus membres no actuen ni es regulen en funció del cycle cel.lular, tot i mantenir un elevat grau d'homologia en la seqüència

Per estudiar si la Ciclina O està sotmesa a una regulació dependent del cycle cel.lular s'ha induït la sobreexpressió de la Ciclina O amb doxiciclina (DOX) durant 12h i al mateix temps s'ha sincronitzat el cultiu cel.lular a les interfases G1/S i G2/M mitjançant el tractament del cultiu amb hidroxiurea (HU) i nocodazol (NOC), respectivament (**Figura 6 A** i confirmació per FACS no mostrada). La hidroxiurea és inhibidor de la ribonucleòtid reductasa responsable de la síntesi dels dNTPs. La depleció d'aquests causa un bloqueig en la síntesi del DNA. El nocodazol impedeix la polimerització de la tubulina i la formació del fus mitòtic i la placa metafàsica, implicant l'inici de la mitosi. Ambdós tractaments han tingut una duració de 12h i l'increment de la mort cel.lular deguda al tractament ha estat despreciable. Els efectes d'aquests tractaments sobre la Ciclina O s'han comparat amb un cultiu asincrònic sense tractar, on la major part de les cèl.lules estan habitualment en fase S.

La quantificació del cycle cel.lular mitjançant el marcatge del DNA amb iodur de propidi i la quantificació per citòmetre de flux ens indiquen que en el tractament amb HU hi ha un 75% de cèl.lules aturades a finals de G1. En aquesta fase els nivells de la Ciclina O detectats per *western blotting* són molt baixos, però es pot identificar la proteïna en les seves formes normal i fosforilada. Els nivells baixos de proteïna en G1 són responsables d'uns nivells basals d'activitat kinasa sobre la Histona H1 i d'autofosforilació (**Figura 6 A i B**). En el cultiu asincrònic un 50% de les cèl.lules sense tractament estan en fase S. En aquestes condicions hi ha un augment de tres vegades en els nivells de la Ciclina O, en la seva forma normal i fosforilada, i de la seva activitat respecte la fase G1 (**Figura 6 A i B**). El tractament amb NOC provoca l'acumulació del 95% de les cèl.lules al final de la fase G2 i en aquest cas s'observa un increment de 5 vegades en els nivells totals de la Ciclina O i la seva activitat kinasa associada, respecte la fase G1 (**Figura 6 A i B**). L'increment en els nivells totals de la ciclina al final de la fase G2 es deu principalment a un augment de la forma defosforilada, ja que la banda d'elevat pes molecular ha desaparegut totalment i en lloc seu apareix una banda de pes intermig originada probablement per un nombre menor de fosforilacions.

Tot i que l'activitat de Cdk2 varia en funció del cycle cel.lular, els nivells d'aquesta proteïna es mantenen constants inclús en condicions de sobreexpressió de la Ciclina O. En aquestes condicions tampoc s'observen canvis en la seva mobilitat electroforètica per possibles reaccions d'autofosforilació del complex Cdk2-Ciclina O (**Figura 6 A**).

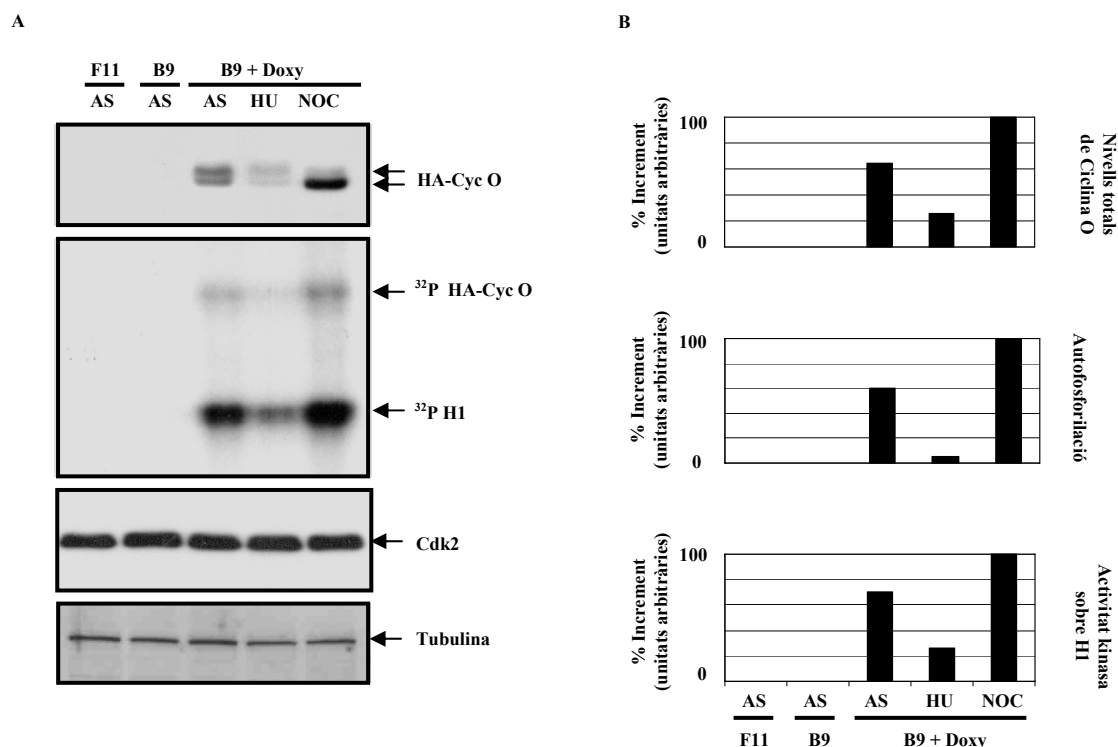


Figura 6. Estabilització i defosforilació de la Ciclina O durant el cycle cel.lular. El tractament del cultiu cel.lular amb hidroxiourea (0,5 mM HU durant 12h) induïx la degradació de la Ciclina O (Cyc O) i la pèrdua de l'activitat kinasa associada, mentre que el tractament amb nocodazol (50µg/ml NOC durant 12h) induïx la defosforilació de la Ciclina O, la seva acumulació i un increment de la seva activitat (**A**). Quantificació dels nivells totals de Ciclina O, de l'activitat kinasa en l'autofosforilació i sobre la Histona H1 en les condicions anteriors (**B**) (el 100% dels nivells de la proteïna Ciclina O, autofosforilació i activitat kinasa sobre H1 fan referència als nivells màxims observats en el tractament amb NOC; B9 és un clon positiu per l'expressió induïble de la Ciclina O i F11 és un clon control).

3 Discussió

3.1 Funcionalitat de la Ciclina O en els *checkpoints* dependents de p53

Un dels tractaments que indueix l'activitat apoptòtica de Cdk2 en timòcits és la radiació gamma. La radiació causa múltiples lesions al DNA i ràpidament hi ha una acumulació de diferents factors implicats en la reparació del DNA en amplis dominis nuclears, anomenats foci, on es localitza el DNA trencat (93). El complex Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) forma part d'aquests foci després de l'exposició de les cèl.lules a la radiació ionitzant, i amb la seva activitat exo- i endonucleasa participa en el procés de reparació del DNA. A més, es creu que aquest complex i altres proteïnes associades poden intervenir en l'inici de la senyalització que donarà lloc a una resposta cel.lular abans de la pròxima mitosi i formació de les cèl.lules filles. Els factors apicals més importants d'aquesta senyalització són ATM i ATR, dues proteïnes kinasa de gran pes molecular sensibles a la integritat del DNA i responsables de l'activació de la conseqüent resposta cel.lular. En la resposta al DNA trencat ATM i ATR fosforilen un seguit de proteïnes que intervenen en la reparació del DNA i en els *checkpoints* del cicle cel.lular, incloent; p53, Nbs1, E2F1, H2AX, 53BP1, Brca1, Smc1, Chk1 i Chk2 (174). L'activació de p53 en resposta al dany al DNA, es dona sobretot per la fosforilació d'ATM i ATR al residu Ser15 de p53 (corresponent al residu Ser18 en la proteïna p53 de ratolí). Aquesta fosforilació actua estabilitzant i activant la funcionalitat transcripcional de p53 capaç d'induir l'expressió de gens necessaris per la resposta de la cèl.lula al dany al DNA (33).

El primer pas necessari per iniciar la reparació del DNA és frenar el cicle cel.lular evitant l'entrada a la mitosi. Part d'aquest retard es dona a través de l'activació de p53 i ha de permetre la reparació física del DNA evitant la propagació de les mutacions a través de la generació de cèl.lules filles danyades. Malgrat l'objectiu reparador i beneficiós d'aquest bloqueig, l'elongació temporal sembla comprometre la funcionalitat i la viabilitat cel.lular. En el cas que la intensitat del dany genòmic no sigui assumible pels sistemes de reparació, o es requereixi un bloqueig temporalment inviable, l'activitat de p53 sembla abandonar la funció bloquejant i reparadora, i es redirigeix cap a una funció apoptòtica. Actualment encara no es coneix què determina l'inici de la resposta reparadora o apoptòtica de p53, però en molts casos depèn del tipus cel.lular i del teixit d'origen, indicant que el *background* genètic i l'estat de la cèl.lula poden influir en la direcció de la resposta de p53 (6,212). Per exemple: la radiació gamma en timòcits promou l'apoptosi immediata dependent de p53, però en cèl.lules MEF l'activació de p53 promou una aturada del cicle cel.lular en G1 que culmina amb la mort de les cèl.lules greument danyades dies després del tractament.

Com hem vist, les cèl.lules MEF tractades amb radiació gamma (10Gy) mostren un increment ràpid i transitori dels nivells d'mRNA de la Ciclina O causats per un increment de la transcripció, i probablement també per un increment de l'estabilitat del mRNA de la Ciclina O. La inducció de la Ciclina O prèvia a l'aturada del cicle cel.lular i a l'apoptosi d'aquestes cèl.lules suggereix una funció d'aquesta proteïna en aquests dos fenòmens. Aquesta hipòtesi està reforçada pel retard del cicle cel.lular i per la disminució de l'apoptosi en condicions d'irradiació que causa la sobreexpressió d'aquesta proteïna en les línies cel.lulars 239HEK i Baf3 (veure **Capítol 2, apartats 1.3 i 1.4**). Aquests resultats *in vitro*, juntament amb la inducció de la Ciclina O *in vivo* en condicions d'irradiació, suggereixen un paper d'aquesta proteïna en el bloqueig de cicle

cel·lular i en la reparació del DNA, tot i que no es pot descartar una funció proapoptòtica posterior.

La cinètica d'inducció de la Ciclina O es veu greument alterada en les cèl·lules MEF deficientes per p53 que han estat irradiades. Aquests resultats indiquen que la presència de p53 és un factor necessari per la inducció de la Ciclina O en condicions de dany al DNA i reforcen la hipòtesi de la Ciclina O com una proteïna implicada en els *checkpoints* del cycle cel·lular, i potser també en l'activitat apoptòtica de Cdk2 observada en timòcits. Cal dir que recentment hem identificat una seqüència consens d'unió de p53 al gen de la Ciclina O, a la vegada que seria interessant estudiar l'activitat de la kinasa Cdk2 i la seva rellevància en l'apoptosi de les cèl·lules MEF. Per dur a terme aquests experiments caldria considerar l'obtenció de cèl·lules MEF deficientes per p21^{Cip1} per tal d'evitar el bloqueig en G1 causat per la irradiació, afavorint l'acció immediata de la maquinària apoptòtica (330). La comparació d'aquests models cel·lulars, el cultiu primari de cèl·lules MEF i de timòcits, evidencia diferents *backgrounds* genètics que poden explicar les diferències existents pel que fa a la proliferació cel·lular i a la resposta apoptòtica. Malgrat tot, la maquinària molecular responsable dels processos apoptòtics intrínsecs podria ser molt similar i extensible a altres models cel·lulars. Aquest seria un clar exemple de la regulació de la resposta de p53 segons un model qualitatiu, on les conseqüències de l'activació de p53 són les mateixes amb independència del conjunt de senyals inductores, però els factors contextuals (el *background* genètic o l'estatus d'altres vies senyalitzadores de la cèl·lula) intervenen en com la cèl·lula interpreta la senyal.

3.2 Efecte de la cafeïna en l'expressió de la Ciclina O

Al 1967 es va descriure l'efecte de la cafeïna en la sensibilització de les cèl·lules a la irradiació i altres agents causants de dany al DNA (310). Posteriorment es veié que la cafeïna inhibia l'aturada del cycle cel·lular en S o en G2/M de les cèl·lules que tenien la proteïna p53 mutada, i permetia la seva progressió fins a una mitosi letal sense deixar temps per la reparació del DNA danyat. Curiosament, la cafeïna no afectava al *checkpoint* de G1, induït principalment per l'expressió de p21^{Cip1} de les cèl·lules amb p53 funcional. Aquesta especificitat funcional de la cafeïna afectant només a les cèl·lules amb p53 mutat va suggerir el seu ús terapèutic per eliminar específicament les cèl·lules tumorals (307,316). Desgraciadament, la cafeïna no és viable com a teràpia clínica pel tractament del càncer, ja que no es poden tolerar les dosis milimolars requerides (90).

Al 1999 es va identificar ATM i ATR com les dianes moleculars de la cafeïna (31). L'activació d'aquestes kinases per dany genotòxic comporta la degradació de Cdc25A (111) i l'aturada del cycle cel·lular a causa de la inactivació dels complexos cdk-ciclina (300). Per contra, l'ús de la cafeïna comporta la inhibició d'ATM/ATR i per tant de les kinases *downstream* ocasionant l'acumulació de Cdc25A, l'activació dels complexos cdk-ciclina i la progressió del cycle cel·lular. Malgrat tot, en aquests experiments no s'observa cap alteració en el *checkpoint* de G1, tot i que aquest és dependent de l'activació de p53 a través de la fosforilació d'ATM/ATR sobre la Ser15 (176,296).

Actualment sabem que la cafeïna no només bloqueja les kinases ATM/ATR, sinó també tots els seus efectes *downstream*. Incrementant la dosi de cafeïna utilitzada antigament fins a dosis pròximes a 10mM s'aconsegueix la inhibició total de les kinases ATM/ATR i la desaparició dels *checkpoints* de G1, S i G2/M, suprimint totalment l'activació de p53 a través de la fosforilació a la Ser15 (66). Curiosament, això no passa en tots els

tipus de dany genotòxic, ja que després del tractament amb UV la cafeïna no té cap efecte, suggerint que aquest tipus de dany pot activar p53 a través d'altres rutes insensibles a la cafeïna, i per tant independents d'ATM/ATR.

En els nostres experiments el tractament de les cèl.lules MEF amb cafeïna redueix l'expressió de l'mRNA de la Ciclina O induïda per irradiació (10Gy). Com s'ha dit, el tractament amb dosis baixes de cafeïna (2mM) comporta la inhibició d'ATM/ATR sobre Chk1/2 i Cdc25, però no altera la seva funcionalitat sobre l'activació de p53. En aquestes condicions tampoc s'altera la inducció de la Ciclina O, suggerint que la regulació de l'expressió de la Ciclina O no és una diana directa d'ATM/ATR ni de les kinases Chk1/Chk2, sinó que probablement està regulada per la fosforilació activadora sobre p53.

Usant un dosi més elevada de cafeïna (5mM) és esperable que hi hagi una inhibició parcial de la fosforilació de la Ser15 de p53 per ATM/ATR, ja que ens aproximem a la dosi efectiva (10mM) on hi ha un 100% d'inhibició d'aquestes kinases. En aquestes condicions es redueix en un 50% la inducció de l'expressió de la Ciclina O després de la radiació gamma. Consistent amb els resultats prèvis, on s'indica que l'expressió de la Ciclina O és dependent de la presència de p53, els resultats del tractament amb cafeïna reforcen la hipòtesi d'aquesta dependència i apunten cap a una regulació transcripcional dependent de l'activació de p53 a través de la fosforilació al residu Ser15. Aquest residu és fosforilat en els timòcits primaris irradiats (resultat no mostrat) i en les línies cel.lulars irradiades (veure **Capítol 2, apartat 1.5**), tanmateix, no es pot descartar la implicació d'altres residus de p53 igualment fosforilables per ATM/ATR (Thr18, Ser20) en la regulació de l'expressió de la Ciclina O.

3.3 Inducció de la Ciclina O per mecanismes postraduccionals de p53

La inducció de l'expressió de la Ciclina O és una resposta ràpida després de la inducció del dany cel.lular. En el cas de les cèl.lules MEF i del timus s'observa un pic màxim d'expressió entre les 2h i 3h després de l'estímul, mentre que en els timòcits disgregats la inducció màxima es dona en menys d'1h (veure **Capítol 4, apartat 2.1**). A la vegada, experiments del mateix tipus en presència de l'inhibidor de la síntesi de proteïnes cicloheximida (CHX) demostren que l'expressió del gen de la Ciclina O és independent de la síntesi *de novo* de proteïnes. Aquests resultats suggereixen la participació de mecanismes postraduccionals prou ràpids per donar lloc a l'inici immediat de la transcripció de la Ciclina O, entre els quals cal destacar la fosforilació de la Ser15 de p53. Aquest mecanisme podria ser suficient per induir l'expressió de la Ciclina O, però no es pot descartar una intervenció no traduccional de p53 mediada per l'activació de factors de transcripció ja existents.

3.4 Expressió de la Ciclina O en teixits adults

La Ciclina O es detecta només al testicle, al pulmó i al cervell, tot i que amb una metodologia més sensible pot ser detectada també al timus, i possiblement a d'altres teixits. Els nivells baixos de la Ciclina O no suggereixen la seva implicació en la funcionalitat normal de la cèl.lula, mentre que la seva inducció per p53 suggereix que podria desenvolupar la seva funció juntament amb el supressor tumoral.

Els ratolins adults mostren molt poca expressió de la Ciclina O i de p53, aquesta última localitzada a algunes cèl.lules del cervell, la pell i la melsa (96,108). Els animals

deficients per p53 són viables, indicant que aquesta proteïna no és vital pel funcionament normal de la cèl.lula, i a la vegada són resistents a l'apoptosi induïda per radiació gamma (108). Aquesta afecta principalment a la melsa, al timus, a l'intestí prim i en algunes zones del sistema nerviós dels ratolins salvatges, indicant que és en aquests teixits més sensibles a l'apoptosi dependent de p53 on curiosament hi ha una baixa expressió de la Ciclina O en condicions normals, i on la Ciclina O s'indueix en condicions d'irradiació (veure **Capítols 4, 5,i 8**), reforçant la possible funcionalitat de la Ciclina O en la resposta de p53.

Fins avui en dia, encara que s'han identificat molts gens proapoptòtics dependents de p53 amb certa singularitat funcional, cap d'ells sembla ser el principal efector de la senyal apoptòtica de p53 (96,165). Tot i que la resposta és específica del teixit i de l'estímul inductor, no es pot descartar l'existència d'un efector comú per dirigir la cèl.lula cap a la reparació i l'aturada cel.lular o cap a l'apotosi.

3.5 Inducció de la Ciclina O independent de p53

Hi ha models experimentals on la inducció de la Ciclina O sembla ser independent de p53. Per exemple, el tractament de cèl.lules limfoides amb glucocorticoides indueix l'expressió de la Ciclina O i l'apoptosi (resultat no mostrat) sense l'activació de p53. Un altre exemple de la inducció de la Ciclina O en absència de p53 és en els embrions (veure **Capítol 9, apartat 2**), on a partir del dia 13 de gestació decau la presència de p53 al mateix temps que hi ha un increment de l'expressió de la Ciclina O en els processos de remodelació de diferents teixits. Aquestes dades suggereixen la participació d'altres vies independents de p53. Aquest factor de transcripció podria estar regulant l'expressió immediata de la Ciclina O per irradiació, o altres estímuls activadors de p53, però hi hauria mecanismes alternatius més lents que regularien l'expressió de la Ciclina O, com en el cas de la mort cel.lular programada que es dona en diferents teixits de l'embrió. Per estudiar aquests mecanismes caldrà determinar el comportament de la Ciclina O en els embrions i teixits adults provinents de ratolins deficients per p53, tot i que els efectes de l'absència de p53 podrien ser minimitzats per l'acció d'altres membres de la seva família, com p63 i p73 (421).

3.6 Regulació de l'estabilitat de l'mRNA de la Ciclina O

L'estudi de l'expressió del gen *ciclina O* en cèl.lules MEF mostra que, igual que en el timus (veure **Capítol 4, apartat 2.1**) hi ha uns nivells basals d'expressió propers al límit de detecció per RT-PCR. Aquests nivells incrementen clarament en condicions en que es produeix dany al DNA, com en el cas del tractament amb radiació gamma, mentre que el bloqueig de la síntesi de mRNA amb ActD impedeix l'expressió després del tractament amb radiació gamma, indicant que possiblement, la inducció de l'mRNA de la Ciclina O després d'irradiació sigui degut a un efecte transcripcional.

Experiments recents en cèl.lules MEF irradiades mostren com la cua de poli-A de l'mRNA de la Ciclina O s'extén en llargada fins a un màxim que coincideix amb la presència dels nivells més elevats d'aquest mRNA, a les 2h postirradiació (experiments no mostrats, en col.laboració amb el grup del Dr Raul Mendez, CRG). Així doncs, aquests resultats suggereixen la confluència d'ambdós fenòmens simultanis, transcripció i estabilització, després del tractament amb radiació gamma.

Malgrat tot, no es pot descartar que l'efecte de poliadenilació i estabilització sigui dependent de p53, éssent aquesta la causa única de l'increment dels nivells d'mRNA de

la Ciclina O en condicions d'irradiació. En aquest cas, després del dany cel·lular s'estabilitzarien i s'acumularien els nivells basals de l'mRNA de la Ciclina O sense la necessitat d'un increment en la transcripció gènica.

Sorprenentment, la inhibició de la síntesi de proteïnes mitjançant el tractament amb CHX també és capaç d'incrementar els nivells de l'mRNA de la Ciclina O amb independència del tractament per irradiació. El mecanisme pel qual la CHX inhibeix la síntesi de proteïnes és a través de l'estabilització del ribosoma sobre l'mRNA, impedit la progressió de la traducció, i afavorint l'acumulació d'aquests complexos. Curiosament, l'mRNA de la Ciclina O en aquestes condicions també s'observa poliadenilat (experiments no mostrats, en col·laboració amb el grup del Dr Raul Méndez, CRG), indicant un possible augment de la seva estabilització. Aquestes dades, fruit del tractament amb CHX, confirmen l'existència d'una síntesi basal de l'mRNA de la Ciclina O en condicions normals de manera independent de la irradiació i de l'activació de p53. A la vegada, el tractament amb CHX provoca una acumulació d'aquest mRNA de manera molt similar a l'observat després d'irradiació, suggerint la possibilitat que aquest últim tractament indueixi un augment de l'estabilització enlloc d'una inducció de la transcripció.

Segurament, l'mRNA del gen *hprt* també s'estabilitza i s'acumula en presència de CHX, però la seva elevada estabilitat en condicions normals fa que el tractament amb CHX no sigui perceptible, probablement fins a temps més llargs.

Aquests experiments en cèl·lules MEF són compatibles amb la inducció de l'apoptosi per irradiació en els timòcits, i permeten explicar la inhibició de l'apoptosi a través de la inhibició de la síntesi de proteïnes i RNA, a la vegada que aporten informació sobre la regulació postranscripcional de la Ciclina O per un mecanisme de poliadenilació.

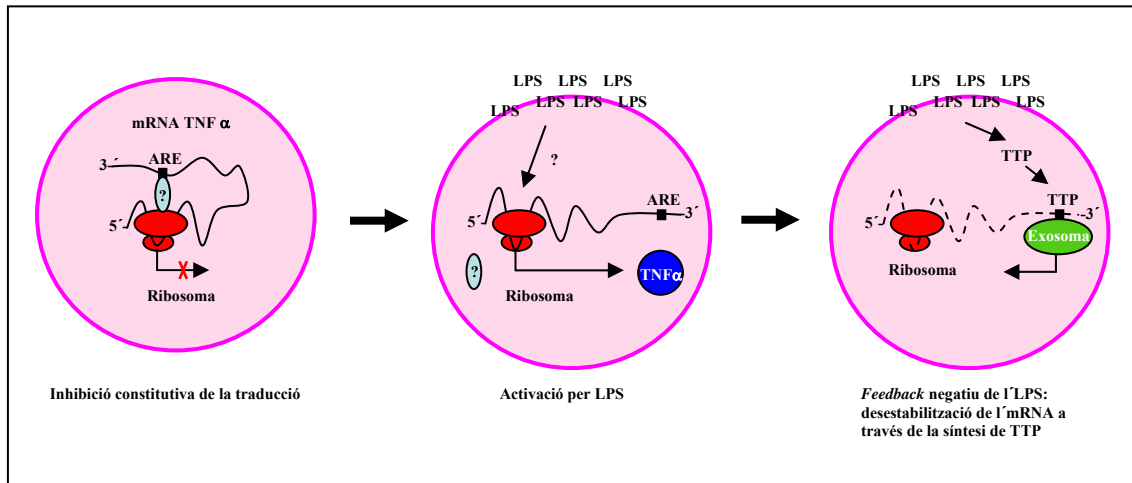
Situats al 3'UTR de l'mRNA de la Ciclina O hem aïllat elements que juntament amb les dades experimentals ens poden ajudar a entendre la regulació postranscripcional d'aquest mRNA. A la regió 3'UTR de l'mRNA de la Ciclina O s'han detectat 3 seqüències canòniques ARE (AUUUA), concretament a les posicions +10, +789 i +1294 posteriors al codó de stop de la regió codificant. Aquests quatre pentàmers distribuïts al llarg del 3'UTR conformen un ARE de Classe I, sovint associat a funcions de control traduccional i estabilitat de l'mRNA.

A la vegada, hem localitzat un hexanucleòtid (AAUAAA) a la posició +574 i una seqüència consens CPE (UUUUUAU) a la posició +196, ambdues posteriors al codó stop (posició 0). Aquests dos elements són necessaris perquè hi hagi l'extensió de la cua de poli-A, modulant la traducció de l'mRNA.

Un dels ARE més ben estudiats, i que podria il·lustrar el funcionament de la regulació de l'mRNA de la Ciclina O, el trobem en el cas de l'mRNA codificant per TNF α (**Esquema 3**). L'ARE descrit en TNF α imposa una forta repressió traduccional en macròfags possiblement a través de proteïnes d'unió a l'mRNA, però quan aquestes cèl·lules són activades a través de LPS (lipopolisacàrid) desapareix l'efecte repressiu i s'observa un augment de 200 vegades en la producció de la proteïna TNF α (129).

El mecanisme d'inducció de TNF α després de l'activació dels macròfags amb LPS, s'ha vist que també comporta la síntesi de la proteïna citosòlica TTP (tristetraprolin) i la seva unió a l'ARE de TNF α . TTP actua com a *feedback* negatiu en la regulació de TNF α , desestabilitzant el seu mRNA poc temps després de la seva inducció. La desestabilització de l'mRNA de TNF α és possiblement a través del reclutament de

l'exosoma, un complex proteínic amb activitat exoribonucleasa 3'→5' per part de TTP (51).



Esquema 3. Representació del funcionament de l'ARE en l'mRNA de TNFα

En el cas de la Ciclina O, la irradiació produeix un fort increment dels nivells de l'mRNA, i tenim evidències que suggereixen la necessitat de l'activació p53 després de la irradiació per induir l'expressió del gen de la Ciclina O.

Malgrat les diferències amb TNFα, en el nostre cas també seria interessant determinar quines proteïnes són capaces d'unir-se a l'ARE i alterar l'estabilitat de l'mRNA de la Ciclina O. Caldria observar també si la síntesi i la interacció d'aquestes depèn de la transcripció mediada per p53 i de l'estimulació per irradiació.

Per que fa a la major extensió de la cua de poli-A, un cas similar es dona en alguns mRNAs de *Xenopus*, on mRNAs dorments com el de la Ciclina B1 contenen una seqüència curta de poli-A, d'entre 20 a 40nt i només quan aquesta cua de poli-A és allargada, fins a uns 150nt, té lloc la producció de la proteïna corresponent. La Ciclina B1 té seqüències CPE que regulen la poliadenilació citoplasmàtica a través de la unió de CPEBs (272).

La traducció induïda per poliadenilació sembla ser un mecanisme característic de les primeres etapes en el desenvolupament de probablement tots els metazoos (366). El fet que en mamífers hi hagi múltiples proteïnes CPEB permet hipotetitzar que el control de diferents RNAs per diferents proteïnes CPEB podria ser específic de teixit, o de l'estímul inductor. Estudis en ratolí demostren que els nivells de CPEB són molt baixos en cèl.lules somàtiques, a excepció de testicles (114), i certs nivells prevalents en cervell (419), precisament dos dels teixits que mostren tenir nivells elevats de l'mRNA de Ciclina O (veure **Capítols 7 i 8, apartat 2**).

3.7 Seqüència PEST a la Ciclina O?

La seqüència *destruction box* responsable de la degradació de les ciclines mitòtiques no es conserva en les ciclines de G1 i tampoc en la Ciclina O

Si definim la seqüència PEST com una regió rica en Pro, Ser, Thr i aminoàcids àcids en qualsevol combinació, i a la vegada flanquejada per aminoàcids bàsics, la Ciclina E no té una seqüència PEST concisa com en el cas de les ciclines D (411). En canvi, hem

vist que la Ciclina E és degradada pel proteasoma després de ser ubiquitinada (411). Això fa pensar que la relació entre les seqüències PEST i la degradació pel proteasoma no és del tot estricte.

En el cas de la Ciclina O tampoc hi ha una seqüència PEST evident, però sí que hi ha una regió rica en Ser, Pro i aminoàcids acídics com Asp flanquejada per dues zones riques en aminoàcids no carregats. Aquesta regió rica en Ser conté dues seqüències SP descrites com el mínim consens per la fosforilació dels complexos cdk-ciclina. I a la vegada, la primera d'aquestes seqüències SP està inclosa dins una seqüència consens fosforilable per GSK3 β , suggerint que la regulació d'aquesta ciclina segueix més el model proposat per les ciclines de G1 que per les ciclines mitòtiques.

3.8 Autofosforilació de la Ciclina O

En condicions normals, la Ciclina O sobreexpressada en un cultiu cel.lular proliferant i asincrònic es detecta com a dues bandes de diferent mobilitat electroforètica per *western blotting*. La banda de més pes molecular recupera el seu tamany normal després del tractament amb fosfatasa alcalina, indicant que la migració electroforètica de la forma més lenta de la Ciclina O es deu a una modificació per fosforilació.

En els experiments de *pull down* i assaig kinasa (veure **Capítol 2, apartat 1.1**) i d'immunoprecipitació i assaig kinasa d'aquesta ciclina s'observa la transferència de grups fosfat radiactius sobre el substrat Histona H1 i també sobre la pròpia Ciclina O immunoprecipitada, reacció coneguda com autofosforilació.

La immunoprecipitació i assaig kinasa de Cdk2 provinent d'un lisat cel.lular que conté la proteïna de fusió GST-Ciclina O també mostra la reacció d'autofosforilació sobre la GST-Ciclina O co-immunoprecipitada (veure **Capítol 2, apartat 1.1**), indicant que la Ciclina O pot ser fosforilada pels complexos Cdk2-Ciclina O. Malgrat aquesta evidència, no es pot descartar que la banda de migració més lenta de la Ciclina O observada per *western blotting* a partir d'un lisat cel.lular sigui fruit de la fosforilació simultània per altes kinases, per altres complexos Cdk2-ciclina o per complexos de la Ciclina O amb altres cdk capaços d'autofosforilar-se.

Per demostrar que l'autofosforilació afecta a la Ciclina O i no als pèptids HA o GST fusionats, s'han realitzat experiments d'immunoprecipitació de la Ciclina O i assaig kinasa usant la proteïna GST o la proteïna de fusió GST-Ciclina O enlloc de la Histona H1 com a substrat. Aquests experiments demostren que la fosforilació es dona específicament sobre la Ciclina O i que l'autofosforilació *in vitro* també pot ser en trans sobre la Ciclina O lliure, sense formar part dels complexos amb cdk (resultat no mostrat). Per tant, podem dir que la Ciclina O és una fosfoproteïna, en part, degut probablement a l'autofosforilació dels seus propis complexos.

3.9 Autofosforilació en Cis o en Trans?

Com s'ha vist fins ara, els complexos Cdk2-Ciclina O poden ser fosforilats entre ells en cis o en trans, possiblement alterant els fenòmens de translocació, estabilització i/o activació del complex.

Diferents experiments mostren com la Ciclina O lliure també pot actuar com a substrat i ser fosforilada *in vitro* pels complexos cdk-Ciclina O (resultat no mostrat). Un mecanisme d'aquest tipus podria actuar *in vivo* i ser el responsable d'un *feedback loop* positiu afavorint la formació de complexos amb la subunitat cdk a partir de la Ciclina O

lliure. Malgrat tot, no es pot descartar que aquesta fosforilació sigui fruit del procés d'immunoprecipitació, ja que en aquest moment l'acostament entre la Ciclina O lliure i la que forma part dels complexos actius podria potenciar la fosforilació en trans en el moment de l'assaig kinasa.

La possibilitat de l'autofosforilació en cis és possible examinant el model estructural basat en el cristall del complex Ciclina A-Cdk2 i comparant-lo amb les ciclins que s'autofosforilen, com la Ciclina E i O. Els estudis de modelatge molecular mostren que la Ciclina O, com la Ciclina A i la Ciclina E (164), té un plegament ciclina que consisteix en dos conjunts de cinc hèlixs- α (resultat no mostrat, en col.laboració amb el grup del Dr Jordi Villà, IMIM). Quan la Ciclina A interacciona amb Cdk2 hi ha un canvi conformacional en l'estructura de Cdk2 que permet l'accés del substrat a la seva zona catalítica (164). Tant la Ciclina E com la Ciclina A contenen un extrem C-ter on es dona la fosforilació per Cdk2 (a la Ser384 en el cas de la Ciclina E) (164,411). Aquest residu està prou allunyat del centre actiu del complex que podria aconseguir posicionar-se fàcilment al centre catalític de la cdk i ser fosforilat en cis (164,411).

Provar aquest mecanisme *in vivo* és complicat, però hi ha certes evidències que el suporten. Per exemple; en les cèl.lules de mamífer els nivells de la proteïna Ciclina E es mantenen quan els complexos Ciclina E-Cdk2 són inactius i els nivells del mRNA de la Ciclina E són molt baixos (en G0 i al començament de G1), consistent amb un efecte en la vida mitjana de la Ciclina E dependent de l'activitat del propi complex. Aquest efecte també es pot observar *in vivo* quan s'inhibeixen els complexos Ciclina E-Cdk2 mitjançant l'expressió d'inhibidors de les Cdk.

La Ciclina O té 6 seqüències S/T(P) fosforilables per complexos cdk-ciclina. Una d'elles, la seqüència Thr281-Pro282 és propera al C-ter i podria ser susceptible a l'autofosforilació en cis. A favor d'aquesta hipòtesi cal dir que el tractament amb l'inhibidor de Cdk2, roscovitina, sembla tenir un efecte positiu sobre l'estabilitat de la Ciclina O. Malgrat tot, aquest efecte es distorsiona al llarg del temps degut a la mortalitat cèl.lular en presència de roscovitina (resultat no mostrat).

Tot i la major eficiència de la Ciclina A respecte la Ciclina O en activar la kinasa Cdk2 (veure **Capítol 2, apartat 1.1**), l'autofosforilació de la Ciclina A és menor que l'autofosforilació de la Ciclina O. Aquest resultat suggereix que l'autofosforilació és un fenomen comú en les ciclins activadores de Cdk2 *in vivo*, com la Ciclina A, la Ciclina E i la Ciclina O, i indica que l'eficiència d'autofosforilació potser no es correlaciona amb l'eficiència de l'activitat sobre altres substrats en trans, com la Histona H1.

3.10 Fosforilació per GSK3

Tant la Ciclina E com la Ciclina D1 poden ser fosforilades per la kinasa GSK3 β , sensibilitzant aquestes proteïnes a patir poli-ubiquitinació i la degradació pel proteasoma (82,402). A més, la Ciclina E conté dos parells de lisines pròximes a la Thr380 fosforilada per aquesta kinasa, (a les posicions 361, 362 i a les posicions 386 i 387), que podrien ser dianes per la conjugació d'ubiquitines a través de l'enzim E3, Fbw7 (189). De manera similar, la Ciclina O conté una seqüència consens altament conservada que podria ser fosforilada per GSK3 β (**Esquema 4**). A més, a quatre residus en direcció a l'extrem C-ter de la diana consens de GSK3 β (Ser63) hi ha un residu Ser (Ser67) conservat en moltes espècies. Aquest residu podria ser la posició *priming site* on es dona la fosforilació prèvia necessària per l'activitat de GSK3 β sobre el seu substrat. Malgrat tot, els experiments *in vitro* mostren com la Ciclina O de ratolí també

pot ser un bon substrat per GSK3 β sense fosforilacions prèvies. Aquest resultat podria ser explicat per la presència d'un residu Asp proper (Asp69) en la seqüència de la Ciclina O de mamífers, ja que amb la càrrega negativa l'Asp69 podria estar simulant la fosforilació al *priming site*, fent que aquesta fos prescindible en algunes espècies.

Prop de la diana consens de GSK3 β (Ser63) hi ha un residu lisina altament conservat (Lys60) que podria ser l'acceptor de la cua d'ubiquïtines just abans d'iniciar la degradació proteasomal. La seqüència anterior a la Lys60 configura una seqüència molt similar a la seqüència consens per la unió de l'enzim E3 ubiquïtina lligasa, β -TrcP (DSGXSS) (175,230) intacte en totes les espècies de vertebrats on s'ha identificat la Ciclina O.

		*	**	***	
Mouse	PLRPLNACSLPGDSG-VCDLFE	SPSSSSD	GADSPAVSAARD	CSSLLNPAQPLTALDLQTF	100
Human	PLHPLNPCPLPGDSG-ICDLFE	SPSSGSD	GAESP--SAARGG	SPLPGPAQVQDLDLQTF	98
Cow	PLQPLNISPLPGDSG-VCDLFE	SPSSGSD	GTDSP---AARD	CSVPVGGAAQQLAQLDLQTF	87
X.laevis	RHRKQRLRLRSCDSG-VADLYE	TPSPSPV	-----APTPTNE	PYDS-P-----	100
X.tropicalis	RHRKQRLRLRSCDSG-VADLYE	TPSPSPV	-----APCPTYE	PWDTCPMSDLRGLQSF	100
Fugu	RRRQKFMKLCDSGFEEDLAP	SPSPSPV	RIEVL--PLRPHAG	QLPTWFLQYGDIGYRIQ	90
Rat	PLRPLNACSLPGDSG-VCDLFE	SPSSSSD	GADSPAVSAVRDC	SSLSSAQLTALDLQTF	100
Chimp	PLHPLNPCPLPGDSG-ICDLFE	SPSSGSD	GADSP--SAARGG	SPLPGPAQVQDLDLQTF	98
Tetraodon	RCRKQTLMSRLSDSGYEEDL	SPSPSPV	QMEVF--APRPHAG	QLSPWYLYQYGDIGYRIQ	97
Dog	PLQPLQPCPLPGDSG-VCDLFE	SPSSGSD	GAESPAAASAALG	CSPLPQPPAQEAVQLDLQTF	100

Esquema 4. Conservació de les probables seqüències d'unió de l'enzim β -TrcP (*), la Lys 60 d'unió a la ubiquïtina (**), i la seqüència fosforilable per GSK3 β (***) en la Ciclina O de diferents vertebrats.

Per confirmar la fosforilació de GSK3 β *in vivo* i determinar el seu possible efecte sobre la Ciclina O s'han tractat les cèl.lues que sobreexpressen Ciclina O amb LiCl, un inhibidor de GSK3 (184,355). La inhibició d'aquesta kinasa estabilitza la Ciclina O, possiblement evitant la unió de la ubiquïtina lligasa β -TrcP, i la conseqüent poliubiquitinació i degradació pel proteasoma. Aquesta ruta de degradació sembla doncs activada per la fosforilació de GSK3 β , potser alliberant la ciclina de la subunitat cdk i fent-la accessible a β -TrcP i al proteasoma.

El tractament amb un inhibidor de l'activitat catalítica del proteasoma, (Cbz-LLnL) (388) també té un efecte estabilitzador de la Ciclina O, encara que la mortalitat cel.lular amb l'inhibidor distorsiona l'efecte al llarg del temps (resultat no mostrat).

En conjunt, una regulació molt acurada de l'estabilitat de la Ciclina O a través de mecanismes similars als que regulen les ciclines de G1 podrien explicar la poca abundància de l'expressió de la Ciclina O en condicions normals o no apoptòtiques.

3.11 Ciclina O en funció dels factors mitòtics?

El fet que GSK3 β reguli l'estabilitat de la Ciclina E i la Ciclina D1 implica que els nivells d'aquestes dues proteïnes depenguin dels factors mitogènics que afecten a l'activitat d'aquesta kinasa (82). Aquest fet no és tan sorprenent en el cas d'aquestes ciclines, ja que conjuntament intervenen en la inactivació de pRb en les primeres etapes del cycle cel.lular. Així, l'acumulació d'aquestes no està només sota el seu control transcripcional, sinó que també hi juga un paper important la presència de factors mitogènics que inhibeixen l'activitat de GSK3 β i la degradació d'aquestes ciclines.

Aquest doble mecanisme també pot ser vàlid per la Ciclina O, és a dir; la seva síntesi podria estar regulada per factors de transcripció, com p53 en condicions de estrès (veure **apartat 2.1**) i la seva estabilitat podria estar regulada positivament a través de la via de Ras i Akt inhibint l'activitat de GSK3 β en absència de factors mitogènics.

Hi ha certes dades que confirmen aquesta doble regulació de la Ciclina O. Per un costat, els efectes de la deprivació de sèrum sobre les línies cel·lulars que sobreexpressen aquesta proteïna són els mateixos efectes que s'observen després d'induir l'activació de p53 per irradiació gamma (veure **apartat 1.5**), indicant que es podria estar afavorint l'activitat de la Ciclina O en ambdós casos, malgrat que en aquests clons cel·lulars la Ciclina O mostri una activitat antiapoptòtica. D'altra banda, s'ha vist que GSK3 β s'inhibeix després d'irradiació i la seva inhibició comporta una pèrdua parcial de les funcions de Mdm2 afavorint l'estabilització i l'activació de p53. Aquest resultat indica que la via de síntesi i de degradació de la Ciclina O poden estar connectades directament entre elles, assegurant que no es donin mai alhora i per tant, potenciant la seva actuació per separat.

3.12 Funcionalitat de les fosforilacions sobre la Ciclina O

En el cas de la Ciclina E les fosforilacions als residus S372, T380 i S384 són necessàries per la degradació de la proteïna a través del reconeixement per l'enzim Fbw7 i la degradació proteasomal (189). Tant GSK3 α com GSK3 β són capaces de fosforilar el residu T380 de la Ciclina E, i amb l'ús de LiCl, inhibidor de les GSK3, s'incrementa la vida mitjana de la ciclina endògena (402).

A més del requeriment de la fosforilació per GSK3 β , el reconeixement de la Ciclina E per Fbw7 es dona només quan la ciclina forma part del complex Cdk2-Ciclina E i està fosforilada al residu S384 per l'activitat Cdk2 (402). L'ús de la roscovitina, inhibidor de Cdk2, té el mateix efecte estabilitzador que el LiCl. Per tant, la fosforilació de GSK3 β i Cdk2 regulen negativament l'estabilitat de la Ciclina E (402).

S'han proposat dos mecanismes no excloents a l'hora d'explicar el requeriment de la unió de Cdk2-Ciclina E per modular la seva degradació per Fbw7. Un primer mecanisme pot ser el requeriment d'aquesta unió per l'activació i autofosforilació del complex per tal de ser reconegut i degradat per Fbw7 (189,402). Aquesta autofosforilació podria actuar també com a *priming site* per la posterior fosforilació de GSK3 β , malgrat que aquestes dues fosforilacions semblen no dependre la una de l'altra. Un segon mecanisme seria que la formació del complex faciliti la translocació de la Ciclina E a un compartiment cel·lular diferent. Per avaluar aquesta hipòtesi s'han testat mutants de Ciclina E incapaçs d'interaccionar amb Cdk2 i aquests es localitzen al citoplasma, mentre que els complexos Cdk2-Ciclina E són preferentment nuclears (402).

Així doncs, un model conjunt comprendria la formació del complex Cdk2-Ciclina E al citoplasma i la seva translocació a nucli on faria la seva funció de control de l'inici de la replicació i on també es donarien l'autofosforilació i la fosforilació per GSK3 β . Aquestes dues fosforilacions desestabilitzarien el complex i la Ciclina E lliure seria translocada un altra cop al citoplasma, on serà reconeguda per Fbw7, poli-ubiquitinada i degradada pel proteasoma.

En el cas de la Ciclina D1 s'ha vist que la fosforilació per la GSK3 β pot facilitar l'export del nucli al citoplasma facilitant la interacció de la Ciclina D1 amb una exportina (82). La Ciclina D1 és una proteïna nuclear durant la fase G1 del cicle cel·lular, però deixa d'estar al nucli durant la fase S. Al citoplasma hi pot haver una

fosforilació majoritària per GSK3 β , potser prevenint la interacció amb una cdk i el seu nou import al nucli. Tant si GSK3 β fosforila la Ciclina D1 al nucli o al citoplasma, o en els dos llocs, s'ha vist que la degradació de la Ciclina D1 ocorre preferencialment al citoplasma (82).

Hi ha precedents de proteïnes que tenen una degradació compartimentalitzada al citoplasma, com per exemple p53. Aquest factor de transcripció és nuclear i pot ser reclutat per Mdm2 i dirigit al citoplasma on tindrà lloc la seva ubiquïtinació i proteòlisi. L'activitat repressora de Mdm2 està regulada positivament per fosforilacions de GSK3 β i s'ha descrit que l'activació de GSK3 β promou la degradació de p53 facilitant el seu export al citoplasma (202). Per tant, l'absència de GSK3 β activa en condicions d'irradiació reté p53 al nucli interferint amb la degradació proteasomal citoplasmàtica.

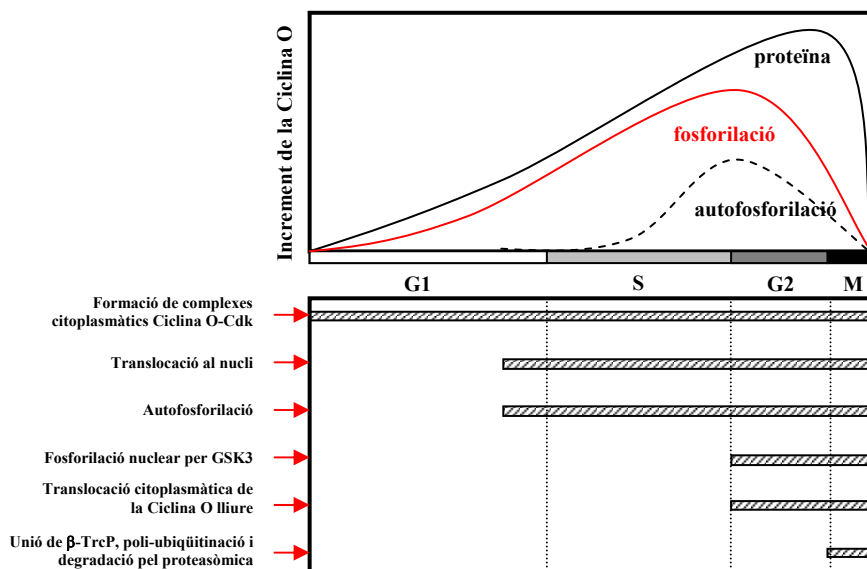
La descripció dels mecanismes de degradació de p53 i de les Ciclines D1 i E ens pot ser útil a l'hora entendre el mecanisme que regula la degradació de la Ciclina O, ja que aquesta forma part de la família de les ciclines i a la vegada sembla estar regulada per p53 (veure **apartat 2.1**).

Com les ciclines reguladores del cycle cel.lular, els nivells de la Ciclina O també semblen fluctuar de manera cíclica. Mentre que en les cèl.lules aturades a G1 els nivells de la Ciclina O sobreexpressada són baixos, les cèl.lules en fase S i en G2/M tenen nivells de Ciclina O creixents amb un increment de fins a 5 vegades en la fase G2/M respecte la fase G1. Aquests experiments s'han dut a terme amb clons cel.lulars que sobreexpressen la Ciclina O, i els nivells fluctuants de la proteïna durant el cycle cel.lular no es corresponen amb els nivells constants del seu mRNA. Aquest fet suggereix que la fluctuació de la proteïna es deu a mecanismes postraduccionals més que a mecanismes relacionats amb la seva síntesi.

Per descartar una possible interferència de la hidroxiiurea i el nocodazol en la síntesi o degradació de la Ciclina O, el mateix estudi s'ha dut a terme a partir d'un cultiu cel.lular proliferant i asincrònic seleccionant les cèl.lules per *sorting* en funció de la fase del cycle cel.lular. Aquests resultats també indiquen un increment en els nivells de la Ciclina O de G1 a G2/M (resultat no mostrat), confirmant les observacions anteriors.

L'acumulació de la Ciclina O durant el cycle cel.lular es correlaciona amb un increment de la seva fosforilació, però quan s'assoleix la seva acumulació màxima a la fase G2/M, deixa d'estar fosforilada. Com s'ha vist anteriorment l'activitat kinasa associada de la Ciclina O, sobre la Histona H1 o sobre ella mateixa, correlaciona amb els nivells totals de la Ciclina O i no depèn del seu estat de fosforilació.

Tot i que caldria estudiar la co-localització de GSK3 β i la Ciclina O durant el cycle cel.lular, així com determinar els residus fosforilables de la Ciclina O i les kinases responsables, les dades obtingudes de la Ciclina O i d'altres publicades sobre la regulació postraduccional de p53 i les ciclines D i E permeten hipotetitzar el següent model (**Esquema 5**):



Esquema 5. Model de la regulació de l'estabilitat, la compartimentalització i l'activitat dels complexos cdk-Ciclina O a través dels mecanismes posttraduccionals

En els clons que sobreexpressen la Ciclina O hi ha un increment dels nivells de la ciclina a partir de G1 fins a G2. Primerament la proteïna s'expressa al citoplasma, on podria ser fosforilada per altres complexos cdk-ciclina. Aquesta fosforilació induiria la formació dels complexos Cdk2-Ciclina O i aquests serien translocats al nucli a finals de la fase G1, on actuarien provocant un retard en la fase de síntesi de DNA (veure **Capítol 2, apartat 1.4**). L'activitat del complex Cdk2-Ciclina O al nucli durant la fase S aniria acompanyada de la seva pròpia autofosforilació. L'acumulació de la proteïna autofosforilada podria actuar com mecanisme encebador per l'activitat de GSK3 β nuclear a finals de la fase S i durant la fase G2. La fosforilació de GSK3 β sobre la Ciclina O podria afavorir l'export nuclear d'aquesta i impedir la nova interacció amb Cdk2 al citoplasma. Al mateix temps, la fosforilació de GSK3 β facilitaria el reconeixement de la Ciclina O pels enzims E3, com β -TrcP, comportant la poli-ubiquitinació i la degradació pel proteasoma al citoplasma a finals de G2 i durant la mitosi, quan l'envolta nuclear és inexistent. A més de la Ciclina O, l'enzim β -TrcP també sembla regular la degradació d'altres elements del cicle cel·lular com; Wee1 i Cdc25 A/B (173,397).

Aquest model concorda amb una autofosforilació dels complexos cdk-Ciclina O i una fosforilació per GSK3 β independents, amb un increment de la Ciclina O al llarg del cicle cel·lular i amb una degradació citoplasmàtica durant la fase M necessària per tal de començar l'increment a partir de la fase G1 del cicle següent. La desaparició de la fracció fosforilada de la Ciclina O en G2/M pot ser degut a la seva degradació, mentre que la banda de pes intermig visible en aquest estadi es deu segurament a fosforilacions parcials de l'abundant fracció no fosforilada. A la vegada, aquest model també és compatible amb l'efecte de retard de la fase S en condicions normals i l'efecte d'arrest transitori en G2 després d'irradiació (veure **Capítol 2, apartat 1.5**) en els clons que sobreexpressen aquesta proteïna, ja que en ambdós casos la Ciclina O es trobaria formant complexos nuclears actius.

Pel que fa a la regulació postraduccional de la Ciclina O endògena encara no hem trobat el sistema que permeti el seu estudi degut a la baixa expressió en condicions no apoptòtiques. Tanmateix, tot fa pensar que l'expressió de la Ciclina O induïda a l'inici de la mort cel·lular programada (veure **Capítol 9, apartats 3.1 i 3.3**), o en condicions d'estrès a través de l'activació de p53 (veure **Capítols 4 i 5, apartat 2.2**), podria actuar seguint el model proposat. En aquests casos la Ciclina O sembla tenir un paper important en l'aturada del cicle cel·lular a les fases S o G2 (veure **Capítol 2, apartat 1.4**) permetent la reparació del genoma abans d'iniciar la mort de la cèl·lula. En condicions d'estrès GSK3 β és inhibida permetent l'acumulació nuclear de p53 (44,202). En aquestes condicions la Ciclina O podria estar constitutivament activa en permanentment durant la progressió de l'apoptosi.

Finalment, és interessant saber que l'activitat GSK3 és inhibida per LiCl, una substància usada en medicina clínica per tractar els pacients amb desordres neurològics. L'ús de molècules petites com els inhibidors de kinases és d'interès per diferents motius. Aquestes molècules són efectives en la seva acció, es poden administrar fàcilment a pacients, i són permeables a les barreres cel·lulars. Així, el tractament amb sals de liti es podrien considerar també com un tractament potencial per al control tumoral.

Objectiu:

**5-Estudi del patró d'expressió i la funcionalitat
de l'activador apoptòtic de Cdk2 *in vivo***

Capítol 4. Expressió de la Cyclina O al timus

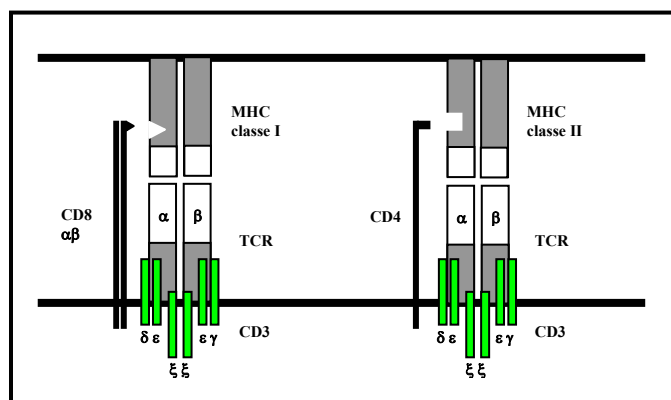
1 Introducció

1.1 Cèl·lules T, receptor TCR i molècules MHC

La diferenciació dels timòcits comença amb la migració d'un progenitor limfoide comú de cèl·lules mare hematopoètiques del moll de l'os en l'organisme adult, o del fetge en el cas d'embrions, cap al timus (145). El timus és un òrgan lobulat i revestit per una càpsula de teixit connectiu laxa a través de la qual es dona la irrigació sanguínia. Aquest òrgan conté dues àrees anatòmicament diferents; una regió externa i densa anomenada còrtex on es situen els timòcits immadurs, i una zona interna coneguda amb el nom de medul·la on migren i maduren durant 2 setmanes (290) (**Esquema 2**).

Les cèl·lules T, a diferència de les cèl·lules B i els anticossos, no reconeixen determinants antigènics per l'estructura plegada de la proteïna, sinó que reconeixen determinants de la cadena peptídica no plegada a través del seu receptor (TCR). Normalment, els antigens reconeguts per les cèl·lules T són prèviament degradats a l'interior de les cèl·lules de l'hoste abans de ser presentats a nivell de la superfície cel·lular per les proteïnes del complex major d'histocompatibilitat (MHC). Les glicoproteïnes MHC pertanyen a la superfamília de les immunoglobulines, i els seus loci són els més polimòrfics que es coneixen en vertebrats superiors, fent poc probable que dos individus compartèixin els mateixos al·lels. Aquestes molècules s'expressen a la superfície de totes les cèl·lules i presenten els antigens diana de les cèl·lules T, complicant el transplantament d'òrgans entre individus que no siguin bessons idèntics (236).

Existeixen dues classes principals de molècules MHC, la classe I i la classe II. Ambdues classes són heterodímers amb estructures més o menys homòlogues i els seus dominis de l'extrem N-ter contenen els residus polimòrfics especialitzats en la unió a l'antigen que serà presentat a les cèl·lules T (**Esquema 1**). Les MHC de classe I s'expressen en gairebé totes les cèl·lules de l'organisme, mentre que les MHC de classe II s'expressen a la superfície de cèl·lules implicades en la resposta immunitària com cèl·lules B, cèl·lules presentadores d'antigen (APC) i cèl·lules epitelials del timus .

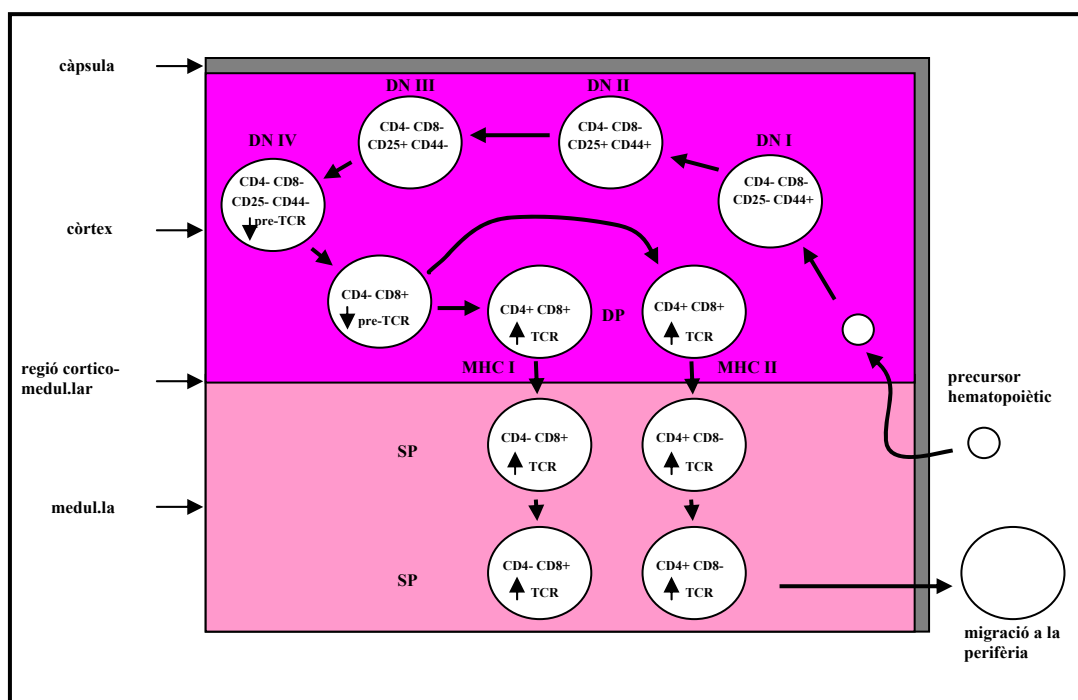


Esquema 1. Estructura proteica dels complexos majors d'histocompatibilitat (MHC I i II), dels receptors de les cèl·lules T (TCR), dels co-receptors CD4 i CD8 i del mòdul senyalitzador CD3.

El timus proveeix d'un entorn essencial per al desenvolupament dels timòcits o cèl.lules T. La diferenciació d'aquestes es dona al mateix temps que estan migrant del còrtex a la medul.la dins el timus. En els primers passos de diferenciació els precursors immadurs de les cèl.lules T són doble negatives (DN) i esdevenen doble positives (DP) pels co-receptors CD4 i CD8, adquirint simultàniament un receptor immadur de cèl.lules T, pre-TCR (**Esquema 2**).

Els timòcits DN són una petita població cel.lular del timus, però donen lloc a la major població de timòcits, els DP (299). Els DN pateixen una proliferació expansiva i una diferenciació que és dependent del seu receptor pre-TCR (95). L'expressió del receptor pre-TCR truncat sense els domini extracel.lular és suficient per dur a terme la seva funció, la proliferació i expansió dels DN resultant en una població DP, de manera que no sembla requerir la unió d'un lligand en aquest punt (159).

Els DN progressen cap a subpoblacions definides per l'expressió de les molècules de membrana CD44 i CD25 en quatre etapes clarament diferenciables: DN I (CD25-/CD44+), DN II (CD25+/CD44+), DN III (CD25+/CD44-), i DN IV (CD25-/CD44-) (322).



Esquema 2. Estructura del timus i maduració de les cèl.lules T.

Els canvis principals en la recombinació del TCR β es donen en el transcurs de DN III a DN IV, precisament quan s'expressa el pre-TCR. Basant-nos en l'anàlisi de la transició de DN III a DN IV s'hipotetitzava que el pre-TCR regula la supervivència, la proliferació, la diferenciació i la decisió del llinatge que han de prendre els timòcits (263).

Com el TCR $\alpha\beta$, el pre-TCR és un complex superficial format per una cadena TCR β clonotípica o variable, una de les dues isoformes de la cadena pT α constant i amb les

cadena de CD3. El pre-TCR s'agrupa espontàniament en clusters de membrana i s'associa amb molècules senyalitzadores a través del segrest en *rafts* lipídics, inclús en absència de lligands, consistent amb la idea que la principal funció del pre-TCR en les primeres etapes DN és la de facilitar l'associació amb el mòdul senyalitzador intracel·lular CD3 (263) (**Esquema 1**). A diferència de TCR $\alpha\beta$, el pre-TCR té una cua citoplasmàtica codificada pel gen *pt α* . La importància d'aquesta cua intracitoplasmàtica és incerta, però té un domini ric en Pro que sembla tenir un paper central en la senyalització del pre-TCR.

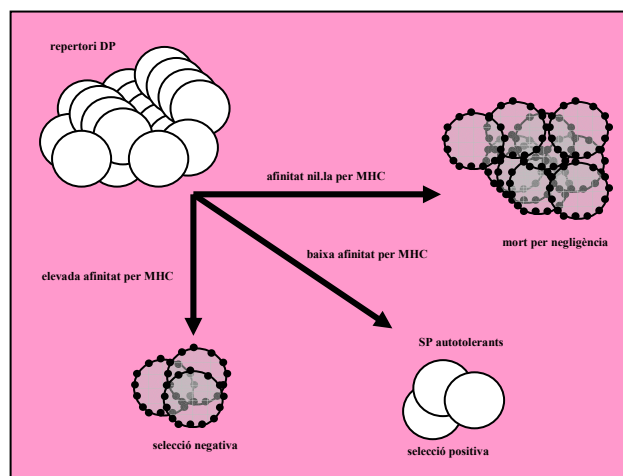
1.2 Mort per negligència, selecció positiva i selecció negativa en timòcits

La població DP serà processada a través de tres mecanismes de selecció diferents segons l'afinitat del seu receptor TCR madur per les molècules MHC. Aquests tres mecanismes es denominen mort per negligència, selecció positiva i selecció negativa (290) (**Esquema 3**).

La mort per negligència és una mort passiva, on el TCR $\alpha\beta$ clonotípic no reconeix el complex MHC. Aquestes cèl·lules deixen de rebre senyals de supervivència, i representa la mort d'aproximadament el 90% dels timòcits DP (290).

La selecció positiva es dona si el TCR s'uneix amb baixa afinitat al complex MHC, resultant en la transducció de senyals de supervivència i diferenciació que permet la viabilitat del 5% dels timòcits DN originals (290). Aquests supervivents expressaran només un dels dos co-receptors, CD4 o CD8, segons la unió al complex MHC de classe II o al complex MHC de classe I respectivament. Els timòcits amb un sol co-receptor (CD4 o CD8) s'anomenen positius simples (SP). Els SP que expressin CD4 esdevindràn cèl·lules T cooperadores, mentre que els SP que expressin CD8 seran cèl·lules T citotòxiques.

Quan hi ha un reconeixement d'elevada afinitat entre el receptor TCR i el complex MHC es dona la selecció negativa per apoptosi del 5% restant de timòcits (290,356). D'aquesta forma s'eliminen els que poden ser potencialment autoreactius amb molècules del propi organisme, causant problemes autoimmunitaris per la seva activació i expansió. Així s'aconsegueix generar un repertori de cèl·lules T perifèriques autotolerants (352,356). Per les cèl·lules que poden escapar a la selecció negativa del timus, hi ha mecanismes reguladors que funcionen a la perifèria, controlant les cèl·lules T autoreactives (322).



Esquema 3. Representació de la selecció dels timòcits autotolerants amb una afinitat baixa pels propies molècules MHC a partir de la població de timòcits doble positius original

A la medul·la del timus hi ha dos tipus de cèl·lules presentadores d'antigen (APC); les cèl·lules epitelials (TEC) medul·lars i les cèl·lules dendrítiques, ambdues crucials en la selecció negativa (398). En les TEC s'ha detectat una expressió gènica promiscua, de gens que són expressats en diferents teixits perifèrics (183). En aquest sentit, aquestes cèl·lules serien capaces de presentar un ampli repertori d'auto-antigens, fent de la medul·la un lloc ideal perquè es doni la selecció negativa.

És possible que els timòcits en desenvolupament pateixin primer la selecció positiva en el còrtex i només després siguin receptius per a la selecció negativa a la medul·la. Aquesta liniaritat en el temps permetria que el TCR transferís una senyal que seria interpretada com a selecció positiva a un estadi inicial en el desenvolupament. La mateixa senyal de TCR podria significar la selecció negativa en un estadi de desenvolupament més tardà (290). Malgrat tot, estudis amb TCR transgènics mostren que la selecció negativa pot ocórrer abans i després que la selecció positiva (284,351). Aquestes dades mostren que els timòcits de qualsevol estadi de desenvolupament (DN, DP, SP) poden patir la selecció negativa (290). Així, que també podria ser que la selecció positiva i negativa fossin totalment independents i no seqüencials.

És àmpliament acceptat que el reconeixement de baixa afinitat comporta la selecció positiva, i que el reconeixement d'elevada afinitat resulta en selecció negativa.

Hi ha dues visions sobre com l'afinitat del lligand del TCR pot determinar el tipus de selecció. Les interaccions d'elevada afinitat ocupen durant més temps els TCRs de la superfície cel·lular. La cèl·lula podria ser capaç de comptar el número de receptors TCR ocupats, de manera que quan una quantitat suficient de receptors estan ocupats els timòcits podrien senyalitzar per patir la selecció negativa. De la mateixa manera aquest model d'ocupació de TCRs determinaria que quan hi ha pocs receptors ocupats s'emeten senyals per la selecció positiva (290).

Els lligands de baixa afinitat tenen un temps de recanvi curt, mentre que els lligands d'elevada afinitat tenen un temps recanvi lent (4). Una segona visió proposa que els lligands de baixa afinitat podrien induir un conjunt de senyals ràpides a través del TCR, mentre que els lligand d'elevada afinitat només podrien induir senyals lentes (238).

La selecció positiva sembla dependent de co-receptors per la unió de TCR i de co-receptors per la unió del complex MHC. En la selecció negativa, la senyalització a través del TCR pot ser independent d'altres co-receptors. Així, encara que els co-receptors CD4 i CD8 semblen tenir importància en la selecció de timòcits, hi ha experiments que demostren que la selecció negativa es dona eficientment en absència d'aquestes mol·lècules. Per exemple; els ratolins deficients en el motiu de la cadena α del TCR responsable de la unió amb CD8, α -CPM, són deficients en la interacció entre TCR i CD8 (86). Tanmateix, aquests ratolins tenen la selecció negativa normal, igual que els ratolins deficients per CD8 (404).

1.3 Factors de transcripció en la selecció negativa de timòcits

Mitjançant la hibridació substractiva s'ha aïllat gens que s'indueixen juntament amb l'apoptosi en hibridomes de cèl·lules T. Entre ells hi ha el receptor òrfan NUR77, que actua també com a factor de transcripció. Aquest gen s'indueix per diferents estímuls com la presència dels factors de creixement del sèrum i NGF (139).

En timòcits, l'estimulació del TCR és un potent activador de la transcripció de NUR77, en canvi, si expressen una versió dominant negativa de NUR77 tenen un bloqueig en la selecció negativa (40), mentre que la sobreexpressió de NUR77 porta a un increment de l'apoptosi (40). Sorprenentment, els ratolins deficients per NUR77 tenen una correcta selecció negativa, segurament degut a un segon membre en la família de NUR77, NOR1 (neuron-derived orphan receptor 1) que pot actuar en lloc de NUR77 (58).

NOR1 té una activitat transcripcional similar a NUR77, és induït ràpidament en timòcits en resposta al TCR, i els timòcits que sobreexpressen NOR1 tenen elevada apoptosi. L'expressió de NUR77 i NOR1 és dependent de Ca^{2+} i és controlada pel factor de transcripció MEF2 (myocyte enhancer factor 2) (423). En cèl.lules T arrestades MEF2 és segrestat per l'inhibidor de calcineurina CABIN1. Després d'un increment en el Ca^{2+} intracel.lular MEF2 es dissocia de CABIN i és transcripcionalment actiu. Aquest procés no es sap si es dona en timòcits, però és rellevant saber que en la selecció negativa, el reconeixement de MHC comporta una entrada de Ca^{2+} en cèl.lules DP (232).

Un altre factor de transcripció que es creu important en la selecció negativa de timòcits és NF-KB. NF-KB no mostra activitat transcripcional en els DP, però sí en cèl.lules T madures. Això es pot explicar per l'expressió de l'inhibidor de NF-KB, I κ B, en les primeres (101). La transcripció del gen *ikb* és induïda pels pèptids que indueixen la selecció clonal, i l'expressió de la proteïna I κ B en timòcits en desenvolupament mitjançant experiments de FTOC comporta la seva mort per apoptosi. Per tant, sembla que la inactivitat de NF-KB en DP pot ser relacionada amb el potencial proapoptòtic d'aquesta molècula.

1.4 TCR i bisenyalització

El TCR és un rar exemple d'un sol complex receptor que pot enviar dues senyals que determinaran reaccions totalment contràries dins la cèl.lula, donant lloc a la supervivència o a la mort de la cèl.lula (403).

El TCR està format per les cadenes α i β extracel.lulars, amb una regió variable externa que permet el reconeixement de les molècules de MHC. Les regions constants de les cadenes α i β , més properes a la membrana de la cèl.lula T, s'uneixen al domini d'unió a l'antigen del complex CD3 (**Esquema 1**). El complex transmembrana CD3 conté tres dimers ($\epsilon\gamma$, $\epsilon\delta$, i $\zeta\zeta$) i és responsable de la transducció de la senyal a través de la part constant del TCR cap a l'interior de la cèl.lula (163). Cada cadena dels tres dímers de CD3 conté motius ITAM (immuno-tyr activation motifs) que poden ser fosforilats en Tyr per les tirosina kinases (PTKs) com la Lck (221).

La cadena α del TCR també conté un motiu α -CPM (α chain connecting peptide motif) en la seva zona més propera a la membrana cel.lular que invariablement està associada a la cadena δ de CD3 (138).

1.5 Activació de les MAPK en la selecció positiva i negativa

La família de les MAPK inclou les kinases p38 i JNK, tot i que aquestes no són les úniques activades en els processos de selecció (47). Entre les diferències que hi ha per la selecció positiva o negativa també hi ha una cinètica d'activació diferent d'ERK (232,404).

En la selecció positiva hi ha una activació lleu però constant, d'ERK, mentre que els lligands que provoquen la selecció negativa indueixen una activació d'ERK forta i transient. En ambdues seleccions s'indueix p38 i JNK amb cinètiques similars (404), però en la selecció positiva els lligands d'elevada afinitat provoquen l'activació d'ERK abans de les altres MAPK (p38 i JNK), mentre que en la selecció negativa els lligands de baixa afinitat provoquen l'activació de les MAPK (p38 i JNK) abans de l'activació d'ERK.

Aquestes cinètiques diferenciades en l'activació de les MAPK en la selecció positiva i negativa podrien ser la causa de conduir els timòcits a l'apoptosi o a la selecció negativa, en el primer cas, i a l'apoptosi o la supervivència i a la diferenciació en el segon cas (234). La diferent activació de les MAPK pot comportar canvis en el conjunt de factors de transcripció. Per exemple: E2F1 és necessari per a la selecció negativa, mentre la deficiència dels factors com Id3 només afecta a la selecció positiva.

Un altra via per la que una activació d'ERK podria portar cap a la selecció positiva és a través de la fosforilació de Bad per la kinasa efectora d'ERK, Rsk (35). La fosforilació de Bad disminueix el seu efecte apoptòtic portant a una major supervivència dels timòcits essencial per superar la selecció positiva.

L'activació aguda, però transitòria, d'ERK en la selecció negativa potser no permet la permanent fosforilació de Bad per tenir l'efecte de supervivència sobre els timòcits.

Finalment, un altre membre de la família de Bcl2, Bim, també és essencial per la selecció negativa, ja que els timòcits dels ratolins deficients per Bim no es seleccionen negativament quan expressen un receptor TCR d'elevada afinitat per MHC (36).

1.6 Formació de diferents complexos TCR en la selecció positiva i negativa

Hi ha canvis dinàmics en l'estructura de TCR a l'hora de transmetre senyals intracel·lulars, formant diferents complexos anomenats TCR-signalosomes. Aquests canvis estan induïts per la unió de TCR als lligands (405).

El que regula la formació d'uns o altres complexos encara és desconegut, però un bon candidat podria ser LAT (linker for activation of T cells). Aquesta proteïna conté 9 Tyr que poden ser fosforilades en diferents combinacions, i cada combinació pot unir diferents proteïnes amb motius SH, donant lloc a diferents complexos o *TCR-signalosomes* (290).

Un model per explicar la selecció positiva i negativa a través del TCR-signalosoma proposa que en la selecció positiva hi ha una fosforilació retardada de LAT que permet reclutar proteïnes a la membrana i generar una mobilització de Ca^{2+} sostinguda i de baixa amplitud, provocant l'activació lenta i constant de Ras i ERK (403).

D'altra banda, la unió amb els lligands d'elevada afinitat podrien induir una forta i ràpida fosforilació de LAT sobre la major part de les Tyr. Aquesta ràpida fosforilació igualment reclutaria proteïnes a la membrana, encara que de diferent origen. Aquesta ràpida fosforilació provocaria una mobilització ràpida del Ca^{2+} i una conseqüent activació ràpida i transitòria d'ERK, característica en la selecció negativa.

Diferents evidències com la necessitat de la fosforilació en Tyr determinades de LAT, i el reclutament de proteïnes necessàries i diferents per la selecció positiva o negativa avalen aquest model (349).

1.7 Elements de l'apoptosi de timòcits

1.7.1 Receptors de la superfície cel.lular

Una de les rutes principals en l'apoptosi de les cèl.lules T perifèriques és a través dels receptors de la superfície cel.lular com FAS (CD95) i TNFR. Aquests receptors contenen dominis d'interacció homofílics, anomenats "death domains", que interaccionen amb els mateixos dominis presents en proteïnes intracel.lulars adaptadores, com FADD (Fas-associated death domain). Aquestes proteïnes adaptadores inicien l'activació de caspases a través d'altres dominis homofílics, anomenats "death-effector domain" (DED), resultant finalment en la mort de la cèl.lula.

1.7.2 Cdk2

Diferents estudis han demostrat que les proteïnes reguladores del cicle cel.lular poden tenir també un efecte sobre la regulació l'apoptosi. Algun d'aquests treballs s'han implicat la proteïna Cdk2 en l'apoptosi utilitzant com a models sistemes on les cèl.lules estan proliferant (1,168,213). En alguns d'aquests estudis s'ha demostrat la participació de Cdk2 com a element essencial per a la progressió dels processos proapoptòtics induïts per la privació de factors de creixement en cèl.lules endotelials humanes, per la radiació gamma, la dexametasona o el xoc tèrmic en limfòcits. Tanmateix, el mecanisme d'actuació d'aquesta kinasa en els processos de mort cel.lular encara no ha estat clarificat.

La proliferació cel.lular dificulta la discriminació de l'activitat de Cdk2 en els processos de regulació del cicle cel.lular respecte dels processos apoptòtics. Els timòcits de ratolí representen una població cel.lular que en estat natural està sincronitzada a la fase G₀, ja que el 90 % d'aquestes cèl.lules en un timus estan en estat de quiescència. Aquest fet natural pot facilitar la discriminació entre la funció de Cdk2 en cicle cel.lular, pràcticament inexistent, de la funció apoptòtica. Els timòcits aïllats d'un timus de ratolí poden ser cultivats *in vitro* i exposats a agents inductors de l'apoptosi com radiació gamma o el glucocorticoide dexametasona (119,126,132). En presència d'aquests agents inductors l'activitat kinasa de Cdk2 augmenta significativament, correlacionant-se amb l'increment en el número de timòcits que pateixen mort cel.lular, mentre que en les condicions control, mantenint els timòcits només en medi de cultiu, l'activitat Cdk2 és pràcticament indetectable.

1.7.3 p27^{Kip1}

Una de les característiques dels timòcits són els elevats nivells de l'inhibidor p27^{Kip1}. La inducció d'apoptosi a través de l'activació de Cdk2 en aquestes cèl.lules es veu acompanyada per una degradació de p27^{Kip1}. En aquestes condicions, la degradació de p27^{Kip1} és veu retardada en els timòcits de ratolins transgènics per Bcl-2, mentre que en els provinents de ratolins transgènics per Bax és més ràpida i eficient, permetent un increment ràpid i sostingut de l'activitat apoptòtica de Cdk2 (119). Així és pot dir que p27^{Kip1}, a més de ser un regulador del cicle cel.lular, actua frenant l'apoptosi. Experiments amb ratolins deficientes per p27^{Kip1} demostren que l'absència d'aquest inhibidor no suposa un increment en l'activitat basal de Cdk2. Tanmateix, quan l'apoptosi ha estat induïda per radiació gamma o dexametasona la inducció de l'activitat de Cdk2 en absència de p27^{Kip1} és major que en els animals salvatges, però la cinètica

d'inducció es manté inalterada (119,182). Aquests resultats indiquen que l'absència de p27^{Kip1} *per se* no és suficient per induir l'activitat apoptòtica de Cdk2, i per tant, calen altres factors inductors d'aquesta kinasa.

1.7.4 p53

En timòcits irradiats hi ha una correlació positiva entre l'activació de p53, l'activació de Cdk2 i l'apoptosi. Experiments duts a terme amb ratolins deficients per p53 demostren que en aquestes condicions la radiació gamma indueix la mort cel·lular dels timòcits, la degradació de p27^{Kip1} i l'increment de l'activitat Cdk2. amb una cinètica molt més lenta. En canvi, la manca de p53 no altera l'apoptosi induïda amb el tractament amb dexametasona (119).

Aquests resultats suggereixen l'existència de dues vies d'inducció d'apoptosi en timòcits on es detecta l'activació de Cdk2. Una de les vies és dependent de p53 i induïble per dany al DNA, mentre l'altra via és independent de p53 i està representada pel tractament amb glucocorticoides. El receptor de glucocorticoides és àmpliament expressat en el sistema immunitari i media diferents respostes i funcions importants, algunes d'elles contradictòries: apoptosi, proliferació, expressió de citoquines o els seus receptors, expressió de proteïnes de fase aguda o de mediadors de la inflamació, la resposta dels anticossos i diferenciació de timòcits i cèl·lules T (169,229).

1.7.5 Bax i Bcl-2

La roscovitina és un anàleg sintètic de l'ATP que pot actuar inhibint reversible i selectivament l'activitat de Cdk2, Cdk1 i Cdk5 (239).

El tractament dels timòcits amb roscovitina inhibeix l'activitat de Cdk2 en apoptosi i al mateix temps la mort cel·lular induïda tant per la radiació gamma, com pel glucocorticoide dexametasona. Aquest fet demostra que l'activitat de Cdk2 és necessària en la mort per apoptosi dels timòcits almenys a través de dos mecanismes diferents (119).

Experiments del mateix tipus amb ratolins transgènics per Bcl2 mostren increments molt moderats en el número de cèl·lules que pateixen mort cel·lular i en l'activitat de Cdk2, mentre que experiments duts a terme amb ratolins transgènics per Bax mostren una elevada mort cel·lular i un ràpid increment de l'activitat de Cdk2 (119). En ambdós casos, els efectes poden ser totalment inhibits amb roscovitina, demostrant que tant Bax com Bcl-2 poden actuar en la mort cel·lular dependent i independent de p53 regulant l'activitat de Cdk2.

L'activitat de Cdk1, en canvi, decau a mesura que incrementa la apoptosi en timòcits (119). Malgrat que Cdk5 també està present en timus i molts altres teixits, la seva activitat està restringida només a neurones (178), per tant, el fet que la roscovitina pugui inhibir l'activitat d'altres proteïnes cdk, com Cdk1 i Cdk5, no compromet el paper de Cdk2 en l'apoptosi de timòcits.

1.8 Posicionament de Cdk2 en l'apoptosi de timòcits

Els processos bioquímics que regulen la selecció negativa ha estat origen de moltes investigacions, evidenciant tant en estudis on s'usen cultius primaris de timòcits, com en estudis amb el timus sencer (foetal thymus organ culture, FTOC) que l'activació de Cdk2 és un pas necessari per l'apoptosi d'aquestes cèl·lules (407).

Per tal d'establir el posicionament de Cdk2 en els processos apoptòtics de la selecció negativa s'ha induït l'apoptosi del cultiu primari de timòcits amb el glucocorticoide dexametasona o amb etopòsid, un inhibidor de la topoisomerasa II que causa dany al DNA de manera acumulativa. Usant l'inhibidor sintètic i reversible de Cdk2, roscovitina, s'ha demostrat que l'activitat Cdk2 és el primer dels events observables en l'apoptosi induïda d'un cultiu primari de timòcits (126). En aquestes condicions, l'activitat Cdk2 és un event *upstream* de l'exposició de la fosfatidilserina a la capa lipídica externa, de l'activació de la Caspasa 8, de la proteòlisi de Bid, de la translocació de Bax a la mitocòndria, de la pèrdua de potencial mitocondrial, de la formació de ROS, de l'alliberació de Citocrom C de la mitocòndria, de l'activació de les caspases 9 i 3, i de la degradació del DNA.

A la vegada, també s'ha demostrat que l'activació de Caspasa 8 és un event *downstream* de l'activació de Cdk2, però *upstream* dels fenòmens mitocondrials (126).

Aquestes dades posicionen l'activació de Cdk2 com l'event apoptòtic més inicial descrit fins l'actualitat. En aquestes condicions els inhibidors de la transcripció i la traducció, actinomicina D i cicloheximida (CHX), respectivament, són capaços d'impedir l'activació de la kinasa Cdk2, bloquejant tots els events *downstream* descrits (119,126).

1.9 Apoptosi espontània

Els timòcits poden respondre induïnt apoptosi per diferents factors com la radiació gamma, els glucocorticoides, els ionòfors de Ca^{2+} i la unió al lligand del TCR (70,119,126,161). A més, simplement el fet de posar-los en cultiu recentment extrets de l'animal és suficient per induir la seva mort cel.lular. Aquesta mort, anomenada apoptosi espontània, és present en tots els cultius primaris de timòcits i es caracteritza per presentar molts dels trets comuns, a nivell bioquímic i morfològic, a la mort induïda per altres estímuls (126,229). Malgrat tot, sembla haver-hi certes diferències entre la mort espontània i la mort induïda, fet que ha justificat l'acceptació de l'apoptosi espontània i l'apoptosi induïda com a processos independents amb capacitat per desencadenar un grau diferent d'apoptosi.

En timòcits de rata i ratolí s'ha caracteritzat l'activitat apoptòtica espontània a través de la detecció de diferents paràmetres apoptòtics.

Quantificant el trencament del DNA en timòcits de rata i ratolí s'ha mostrat que l'apoptosi induïda per radiació gamma o amb glucocorticoides pot ser inhibida fins als nivells de l'apoptosi espontània, sempre present, bloquejant la síntesi de RNA, de proteïnes i l'activitat caspasa (126,229). Per contra, l'apoptosi espontània es mostra invariable amb els inhibidors de la síntesi de proteïnes i de RNA, però mostra una inhibició total quan s'inhibeix l'activitat caspasa amb zVAD. Aquesta inhibició total quan es quantifica l'apoptosi mitjançant el trencament del DNA, és només parcial quan es quantifiquen fenòmens més *upstream*, com l'exposició de la fosfatidilserina de membrana, o l'encongment cel.lular.

D'altra banda, experiments amb timòcits de ratolí mostren que la inhibició de la síntesi de proteïnes amb CHX no té cap efecte sobre l'apoptosi espontània, però la inhibició de l'activitat Cdk2 amb roscovitina inhibeix parcialment l'exposició de fosfatidilserina a la membrana externa (126). En aquestes cèl.lules, la inhibició de les

caspsas amb zVAD inhibeix totalment l'exposició de fosfatidilserina a la membrana externa, la pèrdua de potencial mitocondrial i la producció de ROS. A més, també s'ha detectat l'alliberació del Citocrom C, encara que amb un grau menor que a l'apoptosi induïda. Aquesta alliberació espontània del Citocrom C pot ser inhibida amb inhibidors de la Caspasa 8, però no amb inhibidors de la Caspasa 9 (126).

1.10 L'estroma tímic

El timus és un òrgan limfòide únic, ja que en contrast amb altres òrgans limfòides secundaris el seu estroma està format per cèl.lules epitelials enlloc de cèl.lules derivades del mesènquima (384). Al voltant del dia 10 del desenvolupament embrionari el timus es forma de contribucions de l'endoderm, l'ectoderm i cèl.lules del mesènquima. Les interaccions i la comunicació entre aquestes poblacions tan diferents controlaran el desenvolupament i l'arquitectura de l'estroma del timus.

L'estroma del timus està format bàsicament per cèl.lules epitelials (thymus epithelial cells, TEC) organitzades en una complexa xarxa tridimensional amb una estructura similar a una esponja, ocupant còrtex i medul.la (37,382,385). Es creu que les cèl.lules epitelials medien la biosíntesi dels glucocorticoides, contribuint al desenvolupament i diferenciació de timòcits (377). Els glucocorticoides són hormones esteroides i executen la seva funció unint-se i activant un receptor citoplasmàtic. Després de la unió i l'activació el receptor es trasloca al nucli on regula l'expressió de diferents gens diana. L'expressió de glucocorticoides a les cèl.lules epitelials disminueix amb l'edat, contribuint a la involució del timus. Tanmateix, l'increment dels glucocorticoides a l'organisme també es dona en situacions d'estrès, a través de l'alliberament de la corticotropina (CRH) i adenocorticotropina (ACTH) en l'eix hipotàlam-pituitària-adrenals (HPA). En aquest cas el seu efecte és una disminució de la resposta de les cèl.lules T i del tamany del timus a través d'un procés d'involució en el qual es redueix el nombre de cèl.lules de la glàndula en un període curt de temps (169).

En la major part dels òrgans les cèl.lules epitelials es localitzen prop d'una membrana basal formant capes bidimensionals (2D) de cèl.lules que delimiten diferents estructures dins l'òrgan. En canvi, en el timus les cèl.lules epitelials formen una estructura tridimensional (3D), formant l'estroma (37,382,385). Aquesta organització es forma a partir del dia 14 de gestació, i està controlada, en part, per les cèl.lules T. El desenvolupament d'aquestes està a la vegada controlat per l'estroma en una espècie de comunicació creuada o *crosstalk* (383).

1.10.1 *Crosstalk* entre l'estroma i les cèl.lules T al còrtex i a la medul.la

El còrtex i la medul.la tenen diferents finestres de desenvolupament on es permet la reorganització, l'expansió i el posicionament de les cèl.lules epitelials. Així, en el timus normal d'un ratolí adult les cèl.lules corticals s'orienten de manera perpendicular a la càpsula o envolta del timus, permetent el flux de timòcits en desenvolupament del còrtex cap a la medul.la (381,382). La orientació paral.lela del còrtex d'aquests ratolins vers la càpsula, situació que es dona en els ratolins transgènics per la cadena CD3 ϵ del receptor TCR madur, es creu que és responsable de l'aturada en el desenvolupament de les cèl.lules T d'aquests ratolins en un estadi bastant inicial, DN I (CD25-/CD44+), ja que s'impedeix el flux dels timòcits en desenvolupament cap a l'interior del timus (148). Com a conseqüència, els timus d'aquests ratolins careixen de medul.la,

demostrant que la organització de l'epiteli cortical (l'estroma cortical) és dependent d'un control que queda fixat en les primeres etapes del desenvolupament.

El transplantament de medul·la òssia de ratolins mutants RAG (deficients per la producció de cèl·lules T i B madures) als ratolins transgènics per CD3 ϵ permet la reconstrucció de l'estroma cortical (384). Fruit d'aquesta reconstrucció, la vascularització augmenta en el còrtex del ratolí transplantat i finalment es forma un timus completament normal. Així, la generació correcta del còrtex és un requisit per a la formació de la medul·la, corroborant la formació del còrtex tímic abans que la medul·la en el desenvolupament, i indicant que hi ha una senyalització predominant en direcció cap a l'interior del timus en el mateix sentit que el desenvolupament de les cèl·lules T. Els timòcits més madurs es localitzen al timus en estreta proximitat amb les TEC de la medul·la, on sembla que les interaccions cèl·lula-cèl·lula o que factors secretats per les cèl·lules T, puguin regular l'expansió i diferenciació de les TEC (384).

1.10.2 Organització de l'estroma medul·lar

Històricament la medul·la del timus s'ha considerat com una zona interna del timus, lleugerament tenyida en els talls histològics, i que compren una barreja de cèl·lules epitelials i dendrítiques. Actualment, la representació tridimensional del compartiment medul·lar apareix com a múltiples foci irregulars en algunes seccions i com a àrees úniques i uniformes en altres seccions, indicant que no és tant uniforme com s'havia pensat, sinó que és una estructura reticular complexa, amb extenses arboritzacions i branques secundàries (12). En base amb les similituds fenotípiques s'ha proposat que l'estroma subcapsular i medul·lar es deriven d'un ectoderm embrionari comú, però diferent de l'endoderm que origina l'estroma cortical.

Realitzant un doble marcatge per determinar el recorregut de la vascularització en aquest teixit en dependència de la medul·la s'observa que els elements vasculars s'associen amb regularitat a les regions més epitelials de la medul·la. Aquesta associació curiosament és amb vasos sanguinis de tamany mitjà, i no amb petits capil·lars ni amb grans vasos (12). L'associació de l'estroma medul·lar amb els elements vasculars suggereix que la neovascularització (o angiogènesi) pot ser important en la organització del compartiment medul·lar. A la vegada, els estímuls enviats pels timòcits semblen mediar l'expansió i la diferenciació de les cèl·lules de l'estroma per establir un compartiment medul·lar organitzat (12). Aquesta organització del compartiment medul·lar al voltant dels vasos té un precedent en la melsa. Partint d'aquests estudis, la hipòtesi proposada és que els elements vasculars serveixen per a l'organització de l'estroma de la medul·la, de la mateixa manera que l'estroma medul·lar dicta l'organització de la vascularització en el timus.

1.10.3 Oxigenació i estructura tridimensional de l'estroma

L'increment de la vascularització (angiogènesi) després del transplantament de medul·la de ratolins mutants sense cèl·lules epitelials, (transgènics CD3 ϵ), mostra com n'és d'important l'oxigenació per a la correcta formació del timus amb un estroma organitzat tridimensionalment (384). L'aïllament del timus i el cultiu de l'òrgan sencer en condicions de baixa pressió d'oxigen versus elevada concentració d'oxigen mostra que en el primer cas hi ha una aturada en el desenvolupament de les cèl·lules T a DN I

(CD25-/CD44+) i es perd l'estructura tridimensional de l'estroma, mentre que en elevada pressió d'oxigen el desenvolupament és normal (115).

La pèrdua de l'estructura tridimensional podria ser degut a la manca d'oxigen *per se*, o a l'aturada dels progenitors en condicions de manca d'oxigen. Experiments on es tracta el timus eliminant les cèl.lules T en desenvolupament, tot i mantenir una elevada pressió d'oxigen, mostren també una pèrdua de l'estructura tridimensional. En canvi, si en aquestes condicions es fa un co-cultiu amb progenitors limfòides es restableix l'estructura tridimensional de l'estroma cortical en condicions d'elevada pressió d'oxigen (384). Aquests resultats indiquen que la correcta estructura de l'estroma cortical requereix certs nivells d'oxigenació en el pas de DN I (CD25-/CD44+) a DN III (CD25+/ CD44-).

2 Resultats

2.1 Inducció de l'expressió del gen de la Ciclina O en el timus per la pèrdua de l'arquitectura tissular

En la sortida de la fase G1, i durant el transcurs de la fase S, les cèl.lules en proliferació es caracteritzen per l'activació de la kinasa Cdk2 a través de la interacció amb les subunitats Ciclina E i Ciclina A, respectivament. Per contra, les cèl.lules que no proliferen tenen una greu disminució de l'activitat de Cdk1 i Cdk2, així com dels nivells proteics d'algunes proteïnes reguladores del cicle cel.lular (267,339).

L'activació inicial i necessària de la kinasa Cdk2 en el procés apoptòtic de timòcits induït per radiació gamma, i dependent de p53, ha justificat l'estudi de l'inductor de l'activitat de Cdk2 en apoptosi, ja que cap de les ciclins conegudes fins al moment sembla ser el candidat apropiat per induir l'activació apoptòtica de Cdk2 (119).

La Ciclina O presenta moltes similituds amb la Ciclina A, i a la vegada és capaç d'interaccionar i activar Cdk2 *in vivo*. Tot i que la seva funció encara no és coneguda, diferents resultats suggereixen que, dependent del tipus cel.lular i del teixit, podria estar implicada en processos apoptòtics ja sigui afavorint o frenant-ne la progressió (veure **Capítol 3, apartats 1A i 1B**). En timòcits, l'estudi de l'activitat apoptòtica de la Ciclina O presenta l'avantatge de no interferir en l'activitat de la maquinària del cicle cel.lular, ja que el 90% d'aquestes cèl.lules no proliferen o estan en la fase G0.

Per avaluar la hipòtesi de la possible regulació de l'activitat apoptòtica de Cdk2 per la Ciclina O hem estat seguint l'estudi de l'expressió de la Ciclina O en timòcits a nivell de proteïna i del seu mRNA.

L'estudi dels nivells de l'mRNA de la Ciclina O en el timus mostra com en aquest òrgan extret de ratolí hi ha una expressió basal del gen de la Ciclina O detectable fins a les 2h després de l'extracció (**Figura 1 A**). Tanmateix, la disgregació d'aquest teixit en cèl.lules úniques, majoritàriament timòcits immadurs, provoca un increment sobtat dels nivells de l'mRNA de la Ciclina O en aquestes cèl.lules. L'increment en l'expressió de la Ciclina O coincideix amb el moment de la disgregació (1h després de l'extracció del teixit) tot i que es pot retardar, almenys 2h, mantenint les cèl.lules a 4°C abans de la seva incubació a 37°C (resultats no mostrats).

Al mateix temps, aquest increment de l'expressió del gen de la Ciclina O dependent de la disgregació del timus resulta ser independent de la presència de factors al medi de cultiu, ja que resulta inalterada per la presència de RPMI amb un 10% de FCS (resultats no mostrats). Tanmateix, el cultiu primari de timòcits en aquestes condicions presenta una taxa de mort espontània que incrementa amb el temps en cultiu (**Figura 1 B**).

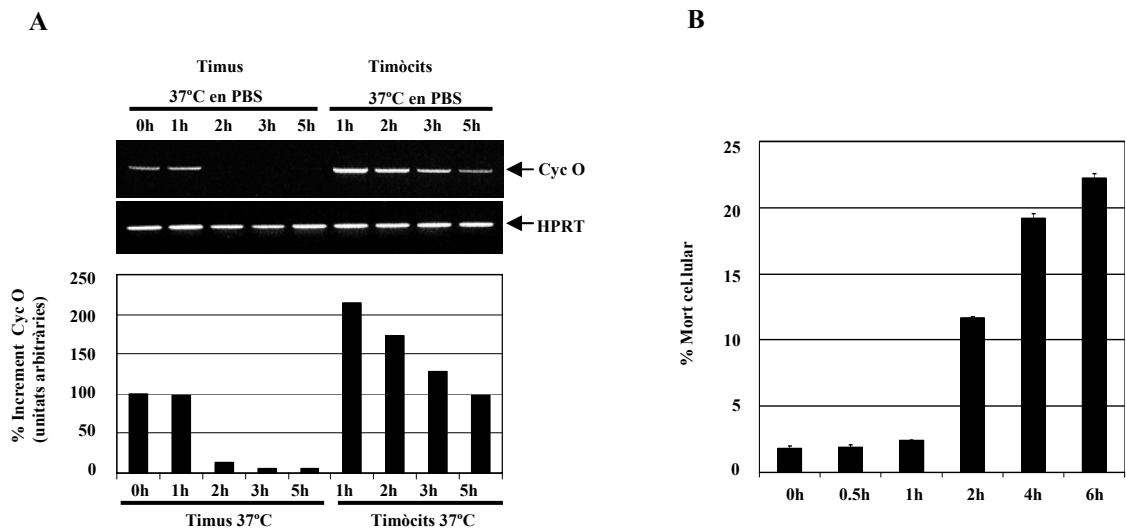


Figura 1. Inducció de l'expressió de la Cyclina O *in vivo* per la pèrdua de l'estructura tímica. Anàlisi semiquantitativa, per RT-PCR, dels nivells de l'mRNA de la Cyclina O a diferents temps després de l'extracció d'un timus de ratolí, en comparació amb els nivells de l'mRNA de la Cyclina O en els timòcits provinents de la disgregació tímica. El temps 0h indica el moment d'extracció del teixit (A). Quantificació de la mort espontània, per fragmentació del DNA, en un cultiu primari de timòcits. El temps 0h indica l'inici del cultiu *in vitro* (B). (el 100% d'expressió de la Cyclina O fa referència als nivells d'mRNA del timus en el moment de l'extracció, 0h).

2.2 Inducció de l'expressió de la Cyclina O en timus en l'inici del procés apoptòtic dependent d'irradiació

La detecció de la Cyclina O *in vivo* mostra com una gran proporció dels timòcits presenta un marcatge gairebé imperceptible per immunohistoquímica. Aquest marcatge situa la Cyclina O en una localització puntual i única, a la perifèria de moltes d'aquestes cèl·lules (Figura 2 A; 0h). En un estadi inicial de la inducció de l'apoptosi al timus, 4h després de la radiació *in vivo*, s'observa un increment en intensitat del marcatge puntual observat en condicions normals i l'aparició d'un marcatge al voltant de cèl·lules que han sofert un increment de volum (Figura 2 A; 4h). 6h postirradiació s'observa una apoptosi massiva en els timòcits, preferentment al còrtex del timus, caracteritzada per un increment notable de núclis petits i arrodonits amb la cromatina condensada. En aquest estat el marcatge de la Cyclina O es manté o disminueix lleugerament, encara que el patró és similar a l'observat a les 4h postirradiació (Figura 2 A; 6h). L'anàlisi semiquantitativa dels nivells de l'mRNA de la Cyclina O en les mateixes condicions corroboren fidelment els nivells de proteïna observats (Figura 2 B).

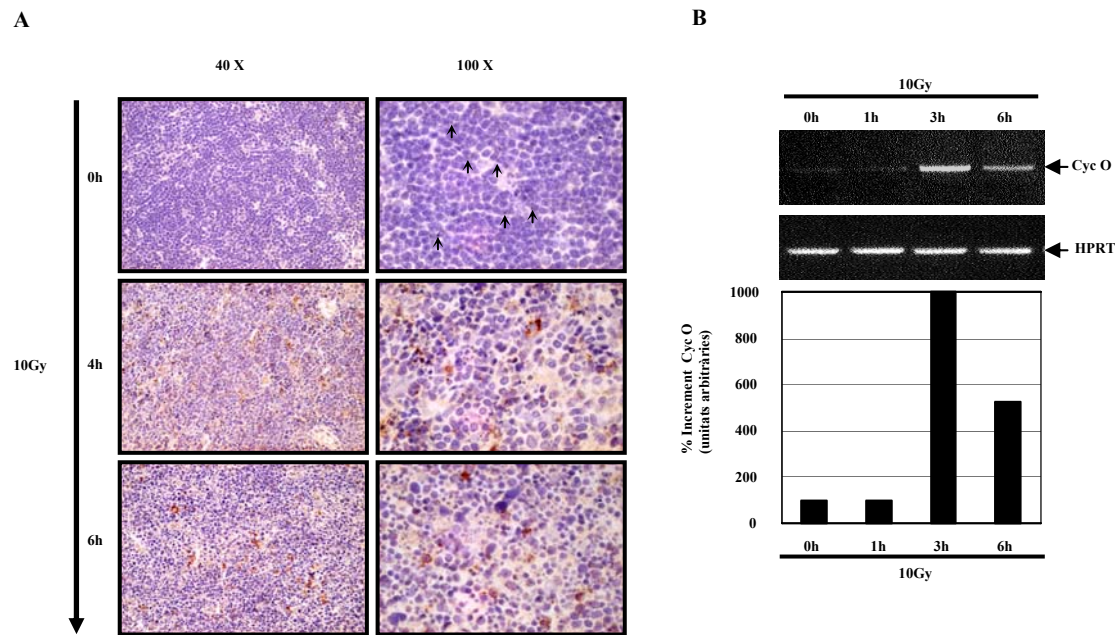


Figura 2. Inducció ràpida de la Cyclina O *in vivo* dependent d'irradiació. Detecció de la proteïna Cyclina O, mitjançant immunohistoquímica, en timus normals i poques hores després d'una irradiació *in vivo* (10Gy). Les fletxes indiquen algunes de les cèl.lules que presenten un marcatge puntual més visible (A). Anàlisi semiquantitativa, mitjançant RT-PCR, dels nivells de l'mRNA de la Cyclina O en timus normals o poques hores després d'una irradiació *in vivo* (10Gy) (B). (el 100% d'expressió de la Cyclina O fa referència als nivells d'mRNA del timus del ratolí no irradiat, 0h).

2.3 Increment dels nivells de la Cyclina O en timus i melsa en etapes posteriors a l'apoptosi dependent d'irradiació

La irradiació *in vivo* causa un increment de l'apoptosi a les 6h postirradiació, tant al timus com a la melsa, amb un grau de severitat que depèn de la dosi d'irradiació, i per tant, del grau de dany al DNA que ha sofert el teixit. L'apoptosi d'aquests òrgans sempre és més evident a la regió del còrtex que a la medul·la (96).

Dosis d'irradiació de 5Gy causen un grau d'apoptosi en timus i melsa que no compromet la vida de l'animal, tot i que hi ha una pèrdua de pes i de l'arquitectura d'aquests òrgans que no es recupera totalment fins als 12 dies postirradiació (247). Dosis superiors poden ser letals. Per exemple: una dosi de 10Gy causa la mort del 25% dels animals a les tres setmanes.

Usant dosis d'irradiació letals (10Gy) hem vist que hi ha un increment ràpid en l'expressió de la Cyclina O que coincideix amb les etapes inicials de l'apoptosi massiva detectable a les 6h (**Figura 2 A i B**), però també hi ha un segon increment dels nivells de la Cyclina O a partir d'1 dia, i almenys fins als 3 dies postirradiació. En aquesta segona onada d'expressió no es detecten nuclis picnòtics amb la cromatina condensada, ja que l'apoptosi de la major part dels timòcits s'ha donat a les primeres 6h postirradiació (**Figura 3**).

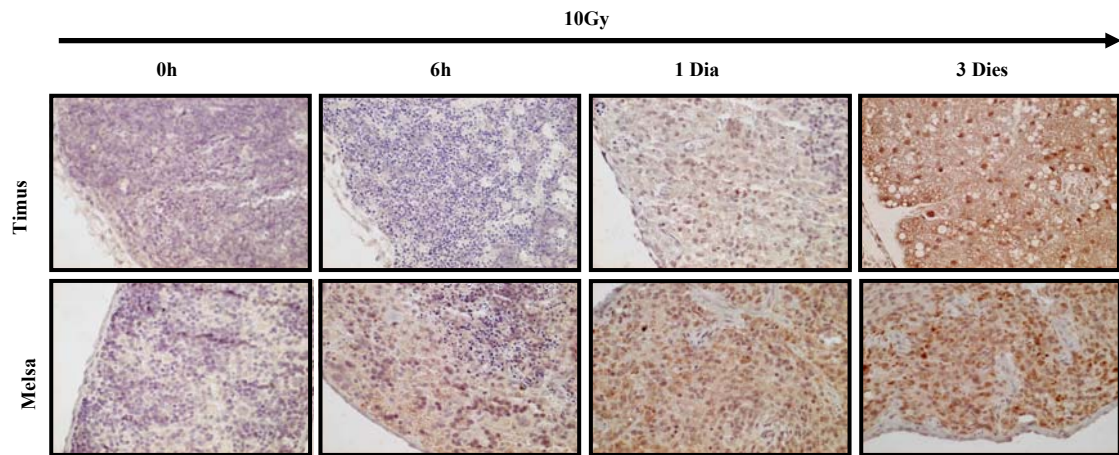


Figura 3. Inducció tardana de la Cyclina O *in vivo* en timus i melsa dependent d'irradiació. Detecció de la proteïna Cyclina O, mitjançant immunohistoquímica, en timus i melses normals i a diferents temps després de la irradiació *in vivo* (10Gy). Augment de les imatges 40X.

3 Discussió

3.1 Apoptosi espontània i Ciclina O

S'ha suggerit que la mort espontània pot ser conseqüència de la privació de factors de supervivència, com per exemple nutrients, hormones, oxigen, etc (229). Si és així, la seva aparició per defecte indica que el limfòcit T immadur està destinat a morir en resposta a un programa apoptòtic intern.

Fins ara, no hi ha evidències que facin incompatible la participació de la Ciclina O en l'apoptosi espontània de timòcits. Aquesta participació podria ser a través d'un mecanisme dependent de la síntesi de RNA i de proteïnes *de novo*, de l'activació de les caspases, dels fenòmens mitocondrials i de la degradació final del DNA. Aquests fenòmens característics de l'apoptosi induïda per radiació gamma o per glucocorticoides també s'han observat en l'apoptosi espontània, encara que amb una intensitat menor (126,229).

En experiments on es quantifica el trencament del DNA per determinar el grau d'apoptosi s'observa que l'apoptosi espontània es mostra inalterable enfront l'ús dels inhibidors de la síntesi de proteïnes i de RNA (229). Aquests resultats no contradueixen l'expressió immediata de la Ciclina O ja que podrien ser explicables pel temps transcorregut entre la disgregació del teixit i l'addició dels inhibidors al cultiu primari. Habitualment l'experimentador disgrega el teixit extret, renta els timòcits resultants una o més vegades amb PBS, quantifica el rendiment de l'extracció, i finalment afegeix els timòcits necessaris en medi de cultiu amb, o sense, els inhibidors pertinents. És en aquest punt, o quan les cèl.lules entren a l'incubador, que normalment es marca l'inici del cultiu primari. Malgrat tot, ha estat en el moment de la disgregació del teixit que s'ha donat la inducció espontània de la Ciclina O. Aquesta inducció és un fenomen fins al moment inevitable, tot i que es pot retardar la seva aparició mantenint les cèl.lules a 4°C. Així doncs, s'ha de tenir en compte que la Ciclina O podria ser responsable dels efectes *downstream* observats en l'apoptosi espontània, de la mateixa manera que també podria influir en els experiments d'apoptosi induïda dels cultius *in vitro*.

El tractament amb zVAD, un inhibidor general de les caspases, disminueix el grau de l'apoptosi espontània observant una disminució de la fragmentació del DNA (126,229). L'activació de la caspasa 3, una de les principals caspases efectores, condueix a la fragmentació del DNA en les últimes fases de l'apoptosi, per tant, l'actuació d'aquest inhibidor en una etapa *downstream* de la via de la Ciclina O podria explicar el seu efecte en la reducció de l'apoptosi. Aquesta hipòtesi és veu reforçada pel fet que els processos intermedis entre la inducció espontània de la Ciclina O i la fragmentació del DNA, com poden ser l'exposició de la fosfatidilserina de membrana i l'encongiment cel.lular, no poden ser totalment inhibits amb zVAD. En aquests casos la ràpida inducció de la Ciclina O podria estar actuant contemporàniament amb l'inhibidor zVAD, de manera que aquest només podria inhibir de manera parcial els possibles efectes letals de la ciclina.

En conjunt, aquestes dades suggereixen la participació de la Ciclina O en l'apoptosi, espontània o induïda, de tots els cultius primaris de timòcits pel simple fet d'haver disgregat el timus inicialment.

3.2 Artefactes dels cultius *in vitro*

Moltes aproximacions en l'estudi dels diferents fenòmens que afecten a les cèl.lules del timus impliquen el cultiu dels timòcits com a cèl.lules disperses i individuals en una suspensió cel.lular, o com a co-cultius amb monocapes de cèl.lules estromals.

Els cultius en suspensió tenen l'avantatge de la simplicitat a l'hora d'aplicar diferents estímuls al medi i determinar-ne els efectes cel.lulars, però hi ha diferents estudis on es demostra que les respostes dels timòcits en aquestes condicions poden ser diferents respecte la resposta *in vivo* o amb el seu microambient intacte (133,256,304).

Un clar exemple el trobem estudiant l'apoptosi induïda per la presència d'antígens en un cultiu de timòcits en suspensió. Mentre l'apoptosi d'aquest cultiu és dependent de TNF-R, la inducció de l'apoptosi *in vivo* a través d'aquesta via és independent d'aquest receptor, indicant que l'apoptosi mediada per TCR requereix la presència del contacte cèl.lula-cèl.lula (289).

3.3 Importància del contacte cèl.lula-cèl.lula

La interacció entre els timòcits en desenvolupament i les cèl.lules estromals del timus són crítiques per la maduració de les cèl.lules T. Per estudiar la funció de les cèl.lules estromals diversos estudis han establert co-cultius de cèl.lules estromals fresques amb línies cel.lulars tímiques crescudes en monocapes. En aquestes aproximacions les cèl.lules estromals recentment aïllades creixen en dues dimensions i alteren el seu fenotip superficial, reduïnt l'expressió del complex MHC de classe II (208). Aquestes dades mostren la dependència que té l'epiteli del timus de la seva estructura tridimensional original, a la vegada que qüestionen els resultats obtingut a partir dels cultius cel.lulars bidimensionals.

3.4 Cèl.lules mioïdes i protecció dels timòcits

Les cèl.lules mioïdes en el timus corresponen a una rara població cel.lular que es localitza a la medul.la i a les unions cortico-medul.lars, precisament la zona on hi ha més evidències que es doni la selecció negativa dels timòcits (393). Aquestes cèl.lules presenten les característiques antigèniques de les cèl.lules de la musculatura esquelètica, ja que expressen myoD, desmina, troponina T, rapsina, utrofina i el receptor d'acetilcolina (245). Sota el terme de cèl.lules mioïdes com a cèl.lules similars a les musculars s'han descrit diferents poblacions cel.lulars localitzades en diferents teixits com el tesicle, on són responsables de les contraccions dels tubs seminífers, i la medul.la òssia durant l'hematopoiesi embrionària (292,314).

La població de cèl.lules mioïdes està conservada al llarg de l'evolució, indicant que probablement tenen una funció important que comparteixen diferents espècies (210). La seva funció *in vitro* sembla ser la protecció enfront de l'apoptosi espontània a través del contacte cèl.lula-cèl.lula (394). Per contra, el co-cultiu de timòcits amb cèl.lules epitelials del timus (TEC), ja siguin del còrtex o de la medul.la, incrementa l'apoptosi en timòcits (394).

Aquestes dades indiquen la importància que poden tenir aquests dos tipus cel.lulars en la selecció negativa dels timòcits, i en el seu transcurs i maduració a través del còrtex i en direcció a la medul.la.

La inducció espontània de la Ciclina O en cultius primaris de timòcits respecte de l'òrgan sencer fa pensar que aquesta expressió podria ser activada per la pèrdua del contacte cel.lula-cèl.lula. Aquest tipus de contacte entre timòcits i cèl.lules mioïdes s'ha demostrat que pot mantenir el timòcit viable *in vitro*.

Seria interessant estudiar si en co-cultiu les cèl.lules mioïdes són capaces de mantenir l'expressió basal de la Ciclina O en timòcits evitant la seva inducció i reduint al mateix temps la mort espontània observada. D'altra banda, les cèl.lules TEC podrien tenir l'efecte contrari i promoure l'apoptosi a través de l'expressió de la Ciclina O. La proporció d'unes i altres s'ha vist que intervé en el grau d'apoptosi dels timòcits en cultiu, potser actuant en sentit contrari sobre la mateixa via (210).

Fins al moment no s'ha descrit cap antígen o co-receptor de membrana a la superfície de les cèl.lules mioïdes que pugui activar la resposta antiapoptòtica sobre els timòcits, però sí que s'han observat alguns dels efectes. Els contactes entre les cèl.lules mioïdes i els timòcits indueixen la fosforilació d'Akt i d'ERK1/2 en els cultius *in vitro* (210). Ambdues kinases són capaces de fosforilar Bad i la Caspasa 9 promovent la supervivència cel.lular (7). Per tant, també seria interessant determinar si aquests elements proapoptòtics s'activen en l'apoptosi espontània o en condicions de sobreexpressió de la Ciclina O en timòcits.

3.5 Oxigenació dels timòcits

Els timòcits, especialment en el transcurs de DN I (CD25-/CD44+) cap a DN III (CD25+/CD44-), semblen intervenir en l'organització tridimensional de l'estroma cortical (384). A la vegada, l'estroma cortical sembla indispensable per la formació posterior de l'estroma medul.lar. També s'ha observat que la correcta arquitectura de l'estroma del timus no només depèn de la presència de cèl.lules T en desenvolupament, sinó també de la correcta oxigenació d'aquestes en el transcurs de DN I (CD25-/CD44+) a DN III (CD25+/CD44-) (384).

Una possibilitat a tenir en compte és la possible regulació de la Ciclina O dependent de la pressió d'oxigen. En el nostre laboratori l'extracció del timus s'ha fet a través del sacrifici per asfíxia de l'animal amb CO₂. Aquest tractament durant pocs minuts podria estar afectant el metabolisme del timus, promovent o inhibint l'expressió de la Ciclina O. La disgregació posterior del timus en l'aïllament cel.lular podria estar canviant la pressió d'oxigen sobre cada cèl.lula. Aquests canvis podrien explicar la inducció espontània de la Ciclina O observada en timòcits recentment aïllats.

Per validar aquesta hipòtesi seria interessant estudiar si la Ciclina O es troba entre els gens diana que poden estar induïts pels factors de transcripció dependents d'anòxia, com per exemple HIF (Hypoxia Inducible Factor) (29,274).

3.6 Inducció de la Ciclina O *in vivo* durant l'apoptosi de timòcits

Actualment s'han proposat dues vies apoptòtiques independents en timòcits. Una de les vies, anomenada extrínseca, implica l'activació dels receptors de la membrana cel.lular de la superfamília del TNF α , com FAS, que posteriorment coincideixen en l'activació de la Caspasa 8 a través del "death-effector domain" (DED) (76,109). Malgrat tot, l'expressió d'un dominant negatiu de FADD comporta una selecció negativa totalment normal, descartant la implicació de FAS i altres receptors que actuen a través de FADD (FAS, TNFR1, DR3 o TNFR25 i TRAILR2 o TNF-related apoptosis

inducing ligand receptor 2) en aquest procés. A la vegada, l'activació de la via extrínseca no comporta una inducció de l'activitat kinasa de Cdk2 (119).

L'altra via, anomenada intrínseca, pot ser activada per la inducció de dany al DNA per irradiació i la conseqüent activació de p53, o per l'acció dels glucocorticoides a través de l'acció transcripcional del seu receptor nuclear (169). En aquesta via l'activació inicial de Cdk2 és necessària perquè les cèl·lules pateixin apoptosi, però paral·lelament s'ha observat una degradació de l'inhibidor p27^{Kip1} que podria ser indispensable, però no suficient, per l'activació d'aquesta kinasa (119).

Les proteïnes de la família Bcl-2, com Bax i Bcl-2, semblen poder regular l'estabilitat de p27^{Kip1} i la inducció d'apoptosi (119). Així, l'activació de Bax o Bcl-2 promouria o inhibiria, respectivament, la degradació de p27^{Kip1} i la conseqüent activació de Cdk2. L'activitat d'aquesta kinasa és l'element més *upstream* descrit fins al moment en la via intrínseca i per tant, podria ser capaç d'iniciar altres events *downstream* com l'activació de la caspasa apical Caspasa 8 (126).

A més de la degradació de p27^{Kip1} calen altres mecanismes per explicar l'activació de Cdk2 en l'apoptosi de timòcits a través de la via intrínseca, ja que els ratolins deficientes per p27^{Kip1} no mostren una activació permanent de Cdk2 ni un augment de l'apoptosi *per se* (182). Alternativament, un increment en l'activitat kinasa específica i/o un increment en els nivells proteics de Cdk2 podrien explicar aquesta activació. Així, malgrat que els nivells de les dues úniques bandes corresponent a les dues formes de *splicing* que presenta el gen *cdk2* de ratolí són constants durant l'apoptosi de timòcits (119), sí que s'ha observat un increment de la fosforilació activadora (Thr160) i la desaparició de les fosforilacions inhibidores (Thr14 i Tyr15) al llarg del temps (resultats no mostrats).

Les alteracions en l'activitat específica de Cdk2 també són possibles per un canvi en l'equilibri de les ciclines que habitualment formen els complexos de Cdk2 actius, o bé, per altres proteïnes capaces de formar complexos amb Cdk2, conduint l'activitat kinasa cap a substrats d'una ruta apoptòtica. Per estudiar aquestes possibilitats s'ha mesurat l'activitat de Cdk2 en apoptosi corresponent als complexos amb Ciclina A i E, les ciclines que habitualment formen els complexos actius de Cdk2 durant el cicle cel·lular. Mentre que l'activitat de Cdk2 incrementa en l'apoptosi de timòcits, tan els nivells de la Ciclina A com els de la Ciclina E es mantenen baixos en cèl·lules no proliferants. El nivell d'aquestes proteïnes i la seva activitat kinasa associada no incrementen en condicions apoptòtiques (119).

També s'ha observat que la Ciclina D2 pot formar complexos actius amb Cdk2, però tant la Ciclina D2 com la Ciclina D3 deixen d'expressar-se en timòcits cultivats *in vitro*, possiblement per la manca de factors de creixement (336). Els nivells de la proteïna Ciclina D1, un tercer membre de la família de les ciclines D, també disminueixen en timòcits i cèl·lules de la melsa després del tractament amb irradiació (172).

Experiments duts a terme amb l'inhibidor de la traducció proteica, CHX, demostren que la síntesi *de novo* de proteïnes és indispensable per l'activació de Cdk2 en l'apoptosi de timòcits (119). En presència de l'inhibidor de la traducció, ActD, el tractament amb radiació gamma o dexametasona també són insuficients per induir apoptosi (229). Aquests resultats fan pensar que una proteïna de nova síntesi en condicions apoptòtiques podria actuar com a activador apoptòtic de Cdk2.

Conciliant els resultats anteriors, la inducció de l'apoptosi en timus mitjançant irradiació induïx l'aparició de la Ciclina O en cèl.lules preapoptòtiques. En aquestes condicions, els nivells de mRNA prediuen una inducció temporal de la Ciclina O compatible per actuar proapoptòticament i induir la mort de la major part dels timòcits a les 6h postirradiació.

Aquesta cinètica proapoptòtica coincideix amb l'activació de p53, la degradació de p27^{Kip1} i l'activació de Cdk2 (119), a la vegada que experiments en línies cel.lulars han demostrat la capacitat de la Ciclina O per unir i activar la kinasa Cdk2. Aquests resultats suggereixen la participació de la Ciclina O com a activador de Cdk2 en apoptosi i fan plausible la formació del complex Cdk2-Ciclina O actiu en timòcits apoptòtics. Malgrat tot, els nivells baixos de la Ciclina O, la seva expressió en un estret marge de temps, i les limitacions del anticossos generats fins al moment no han permès encara la detecció del complex Ciclina O-Cdk2, per co-immunoprecipitació i assaig kinasa, en el timus apoptòtic.

p21^{Cip1} és un inhibidor de l'activitat Cdk2 regulat per p53 que s'expressa a nivells baixos en timòcits (109). És d'esperar que després de la irradiació i la conseqüent activació de p53 els timòcits incrementin també l'expressió de p21^{Cip1}, però com s'ha vist en les cèl.lules epitelials de l'intestí prim (veure **Capítol 5, apartat 1.2**), els nivells elevats de p21^{Cip1} no semblen interferir en la funció apoptòtica quan els nivells de p53 es mantenen elevats (119). Al mateix temps, cal destacar la funció proapoptòtica de p53 en timòcits irradiats, ja que els timòcits aïllats de ratolins deficientes per p53 no pateixen l'apoptosi induïda per radiació gamma (119,222). Aquests resultats, i la possibilitat que l'expressió de la Ciclina O també estigui regulada per p53 (veure **Capítol 3, apartat 2A 2.1**), suggereixen una participació proapoptòtica de la Ciclina O en l'apoptosi de d'aquestes cèl.lules. Per refermar aquesta hipòtesi seria interessant comprovar l'expressió de la Ciclina O en els timòcits irradiats de ratolins deficientes per p53, de la mateixa manera que resultaria informativa la co-localització de p53 i la Ciclina O en la mateixa cèl.lula apoptòtica malgrat la dificultat en la detecció per immunohistoquímica de proteïnes proapoptòtiques (247). Tanmateix, la identificació definitiva de la Ciclina O com a activador de Cdk2 en timòcits només pot provenir de ratolins deficientes per la Ciclina O. En aquests, com passa en els animals deficientes per p53, esperem que els nivells de l'apoptosi espontània i induïda per radiació siguin menors, sinó nuls.

L'expressió basal de la Ciclina O es pot detectar puntualment en alguns timòcits en condicions normals. És possible que els timòcits en desenvolupament pateixin primer la selecció positiva al còrtex i després siguin receptius per a la selecció negativa a la medul.la, afectant només a un 5% de timòcits en un moment donat (290). Fins al moment no hi ha evidències d'una sincronització en el procés de maduració dels timòcits, de manera que una cèl.lula amb elevada afinitat pels complexos MHC podria patir les conseqüències letals de la selecció negativa a través de la inducció de la Ciclina O i un augment de l'activitat de Cdk2. En aquest escenari la selecció negativa es desenvoluparia de manera molt discreta i puntual en el conjunt del teixit, de la mateixa manera que s'observen algunes cèl.lules apoptòtiques positives per la Ciclina O en condicions normals (resultat no mostrat). En teixits, aquests nivells baixos d'apoptosi són difícilment detectables degut a la fagocitosis d'aquestes cèl.lules pels macròfags.

3.7 Factors de transcripció inductors de la selecció negativa

La Ciclina O en condicions normals es localitza en forma de punt a la regió perifèrica dels timòcits, tant de la medul·la com del còrtex. Seria interessant determinar si aquesta expressió basal i aparentment constitutiva és dependent de p53.

Altres factors de transcripció que podrien induir l'expressió de la Ciclina O en la regulació de la selecció negativa a través de l'activació del TCR són NUR77 i NOR1. Ambdós són factors proapoptòtics de la mateixa família que el factor de transcripció NFkB, però a diferència d'aquest s'indueixen ràpidament per l'activació del TCR en reconeixement al complex MHC (40,416). Així doncs, aquestes dues proteïnes podrien regular l'expressió de la Ciclina O en el cas que p53 no guiés la seva inducció en la selecció negativa.

Alternativament, l'activitat antiapoptòtica de NF-KB està bloquejada pel seu inhibidor IKBNS en els timòcits DP, però no en les cèl·lules T madures (290). Aquest bloqueig pot estar relacionat amb el risc potencial que tenen els timòcits DP a patir apoptosi en la selecció negativa. En aquest cas seria determinar si NF-KB seria capaç d'actuar com a repressor de l'expressió del gen *ciclina O*.

3.8 Inducció de la Ciclina O *in vivo* en cèl·lules del timus

Els ratolins exposats a dosis subletals de radiació gamma (5Gy) mostren un increment de l'apoptosi dependent de p53 al timus i a la melsa 6h després d'irradiació (247), com s'observa també en el nostre cas (10Gy) (**Figura 3**). Aquesta apoptosi, identificable per l'increment massiu de nuclis picnòtics tenyits amb hematoxilina, provoca una pèrdua de pes i de l'arquitectura del teixit que no es recupera totalment fins 12 dies després del tractament (247).

En aquests teixits es pot determinar l'increment de l'expressió de gens diana de p53, com Bax i p21^{Cip1}, fins les 24h, mentre que l'increment de p53 i l'activitat Caspasa 3 es segueix detectant fins a 4 dies postirradiació en la major part de les cèl·lules del teixit (96). Com és d'esperar, no es detecta l'expressió de p53 ni dels seus gens diana en timus i melsa en animals no irradiats, o deficientes per p53 (96).

En altres teixits, com en el fetge, s'ha descrit molt poca activitat Caspasa 3 i no es detecta apoptosi ni la inducció de p53 després del tractament amb radiació gamma. Per contra, p21^{Cip1} s'indueix fortament en el fetge irradiat, i en menor grau en melsa i timus (96). Com s'ha vist en altres capítols, p21^{Cip1} té un efecte protector de la mort enfront de la radiació, i el seu grau d'inducció coincideix amb els teixits que tenen menor activitat apoptòtica dependent de p53 i menor activitat Caspasa 3 (96).

Curiosament, en cèl·lules apoptòtiques no és fàcil detectar l'expressió de p53 (247), i el mateix passa amb Ciclina O. Les cèl·lules amb la cromatina condensada mostren un marcatge baix o nul de la Ciclina O visible a les 6h postirradiació (**Figura 2 A i Figura 3**). En aquestes condicions, fins i tot hi ha una disminució de la síntesi de mRNA de la Ciclina O en el timus (**Figura 2 B**). En canvi, es possible detectar millor l'mRNA i la Ciclina O en cèl·lules preapoptòtiques a les 3-4h postirradiació, quan la condensació del DNA tot just comença (**Figura 2 A**).

Per explicar aquesta aparent contradicció s'ha proposat que la intensa condensació de la cromatina tenyida amb hematoxilina, i la degradació de proteïnes per les caspases, poden impedir la detecció de proteïnes per immunohistoquímica en cèl·lules apoptòtiques (247). Es de suposar que la condensació de la cromatina i la

disfuncionalitat de les cèl.lules apoptòtiques també poden afectar greument la síntesi *de novo* de qualsevol producte gènic durant les últimes etapes de l'apoptosi.

La detecció d'aquestes proteïnes proapoptòtiques després de l'apoptosi massiva soferta a les 6h postirradiació pot ser difícil d'explicar, ja que s'ha observat un increment de la Ciclina O fins als 3 dies (**Figura 3**), de la mateixa manera que ha estat descrita l'expressió de p53 i l'activitat Caspasa 3 fins als 4 dies. Una possible explicació de l'increment d'aquestes proteïnes és una cinètica d'apoptosi més lenta en les poblacions que conformen l'estroma del timus i la melsa, i potser dependent de la correcta vascularització i oxigenació i de la presència de timòcits immadurs en el cas del timus. L'eliminació d'aquests en l'apoptosi a les 6h podria afectar greument l'arquitectura del teixit i l'organització 3D de les cèl.lules epitelials de l'estroma. Aquesta pèrdua de la tridimensionalitat podria passar per una segona onada d'apoptosi estructural induïda per p53 i Ciclina O coincidint amb la pèrdua de pes i de volum. La regeneració del timus i melsa irradiats passa probablement per la fagocitosi de les cèl.lules apoptòtiques i per la regeneració dels teixits a partir de cèl.lules provinents de la medul.la òssia efectiva als 12 dies postirradiació (247).

Per finalitzar cal tenir en compte que fins avui en dia, encara que s'han identificat molts gens proapoptòtics dependents de p53, cap d'ells sembla ser el principal efector de la senyal apoptòtica de p53 (96). El gen *ciclina O* podria ser un gen diana de p53 induït en l'apoptosi de diferents tipus cel.lulars i diferents teixits (veure **Capítol 3, apartat 2A 2.1 i Capítols 5, 7 i 8, apartat 2.2**), potser com a inductor o modulador general de l'apoptosi dependent de p53.

Capítol 5. Expressió de la Ciclina O a l'intestí prim

1 Introducció

1.1 Fisiologia de l'intestí prim

L'intestí prim és un conducte llarg format per 3 zones contigües diferenciables (duodè, jejú i ili) amb la funció de completar la digestió començada a l'estómac i absorbir els productes digerits. Durant el trajecte alimentici pel tracte gastro-intestinal, l'intestí prim ofereix la màxima absorció.

A la llum de l'intestí s'hi dona la digestió facilitada en gran part pels enzims pancreàtics adsorbits a la seva mucosa. A la vegada, la membrana plasmàtica de les cèl.lules de l'intestí prim que estan en contacte amb la llum del tub digestiu contenen proteïnes enzimàtiques que faciliten la digestió en aquest entorn. La disposició de les cèl.lules en forma de criptes i vellositats, i la llargada del tracte (de 4 a 6m en humans) suposa un increment de la superfície que facilita la digestió local i l'absorció de les molècules a través de les membrana plasmàtica cel.lular.

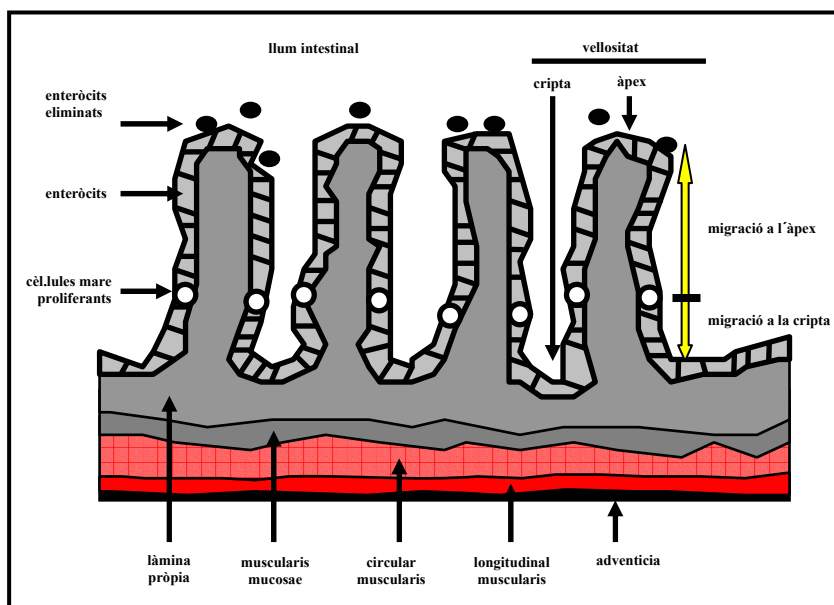
Les cèl.lules epitelials de la paret intestinal formen plects en direcció a l'exterior, anomenats vellositats, que són contigus als plects més profunds o en direcció a l'interior, anomenats criptes. Les cèl.lules de l'epiteli que forma les vellositats i les criptes són principalment de quatre tipus; enteròcits, cèl.lules caliciformes, limfòcits i cèl.lules plasmàtiques. Els enteròcits són cèl.lules primes i columnars amb el nucli disposat basalment i uns microvil.li d'1µm de longitud que conformen la cara apical en contacte amb la llum de l'intestí. Aquestes cèl.lules estan implicades en els processos de digestió i absorció a través de la membrana plasmàtica. Sota els enteròcits hi pot haver alguns limfòcits i cèl.lules plasmàtiques situades basalment i reativament properes a un capilar sanguini. Les cèl.lules caliciformes són cèl.lules epitelials columnars modificades per tal de sintetitzar i secretar mucus. Aquestes cèl.lules presenten una polarització molt marcada, ja que a la part propera de la membrana basal el citoplasma conté un prominent aparell de Golgi, mentre que a la part apical s'hi observen nombrosos grànuls de mucigen. Aquests grànuls són alliberats per exocitosis i el seu contingut en contacte amb l'aigua extracel.lular formarà el mucus

A l'epiteli de recobriment de l'intestí prim la divisió cel.lular està limitada a la porció inferior de les vellositats, en una anella d'unes 20 cèl.lules al voltant de la vellositat on resideixen ancorades les cèl.lules mare. (**Esquema 1**). Aquestes cèl.lules mare es divideixen produint dues cèl.lules filles. Una d'aquestes es queda al mateix lloc com a cèl.lula mare no diferenciada, mentre l'altra migra cap amunt o cap avall formant l'epiteli d'enteròcits que recobreix de forma contínua les vellositats i la criptes. Quan els enteròcits comencen la migració es diferencien i s'especialitzen en les funcions de digestió i absorció al mateix temps que aturen el seu cicle cel.lular. Les cèl.lules intestinals que migren apicalment tenen una vida molt curta, essent expulsades a l'extrem superior de la vellositat al cap de cinc dies d'haver-se generat.

Diferents capes de teixit recobreixen internament el tracte digestiu. Entre elles cal destacar la làmina pròpia, la muscularis mucosae, les capes musculars i la capa adventícia. La làmina pròpia és la matriu de teixit conjuntiu ric en fibroblasts que hi ha dins les vellositats i entre les criptes. Aquesta matriu conté una xarxa vascular i limfàtica extensa a través de la qual es distribueixen els productes digerits i adsorbits

per les vellositats. En un tall transversal de les vellositats es poden veure cèl.lules sanguínies dins els capil.lars de la làmina pròpia. Aquests capil.lars tendeixen a disposar-se perifèricament, just sota els enteròcits.

La muscularis mucosae és una capa de teixit muscular llis que cobreix internament les vellositats. Sota la muscularis mucosae del duodè hi ha les anomenades glàndules de Brunner disposades de manera dispersa. Aquestes glàndules responen secretant una capa prima de mucus alcalí en resposta al contingut àcidic provinent de l'estómac que ajuda a neutralitzar el contingut estomacal evitant l'autodigestió de la mucosa duodenal. Just sota la muscularis mucosae hi ha una capa circular i una capa longitudinal de múscul llis que produeixen una activitat peristàltica contínua al llarg de l'intestí prim. Finalment, la capa de submucosa vascular, o adventícia, és una capa epitelial que recobreix internament les estructures de la paret intestinal (406).



Esquema 1. Secció transversal de la paret intestinal

1.2 Expressió de p53 i p21^{Cip1} en l'apoptosi induïda dels enteròcits de ratolí

Segons el tipus cel.lular, i si les cèl.lules estan proliferant o no, el dany al DNA pot produir una aturada en G1 o G2 dependent de l'activació de p53 (2,130,359). Aquesta aturada pot permetre la reparació del dany, o alternativament s'indueix una ràpida mort cel.lular per apoptosi (75,422).

En cèl.lules proliferants com els limfòcits T i els fibroblasts, el dany al DNA causa la mort de la cèl.lula amb independència de p53. Aquests resultats suggereixen que en alguns tipus cel.lulars hi ha mecanismes independents de p53, però igualment importants, que poden induir la mort de les cèl.lules danyades (346,360).

En les cèl.lules epitelials de l'intestí prim s'ha descrit una onada de mort entre les 4 i les 8h després de la radiació gamma (8Gy) que disminueix a les 24h. Aquesta apoptosi és dependent de p53, ja que no s'observa en ratolins KO (61,244), suggerint que els enteròcits són radioresistents en aquests ratolins (**Esquema 2**). Malgrat tot, estudis a temps més llargs indiquen que hi ha una mort tardana en les cèl.lules epitelials de

l'intestí prim dels ratolins p53 KO. Aquesta mort comença a les 24h i perdura estable a les 40h, però tot i que quantitativament no arriba al 50% de l'apoptosi p53 dependent es localitza a les mateixes posicions (243). Les cèl.lules apoptòtiques p53 negatives tenen l'aparença de cèl.lules gegantines amb diferents fragments de cromatina condensada dins el nucli. El DNA d'algunes d'aquestes cèl.lules està fragmentat, i per microscopia electrònica s'ha observat que la morfologia d'aquestes cèl.lules té similituds a les cèl.lules mitòtiques (243).

L'expressió de p21^{Cip1} és un dels mediadors del bloqueig del cicle cel.lular dependent de l'activació de p53 (79,395). p21^{Cip1} bloqueja la progressió del cicle cel.lular inhibint els complexos cdk-ciclina (420), explicant el defecte en l'aturada atenuada del cicle cel.lular després de dany al DNA en condicions on s'ha perdut la funcionalitat de p21^{Cip1} (38).

L'expressió de p53 a l'epiteli intestinal incrementa en resposta a la radiació gamma. Com ja s'ha dit, hi ha una resposta apoptòtica aguda (entre les 3-6h després de la radiació) totalment dependent de p53, i una resposta a temps més llargs (a les 24h després de la radiació) que és independent de la seva expressió (243).

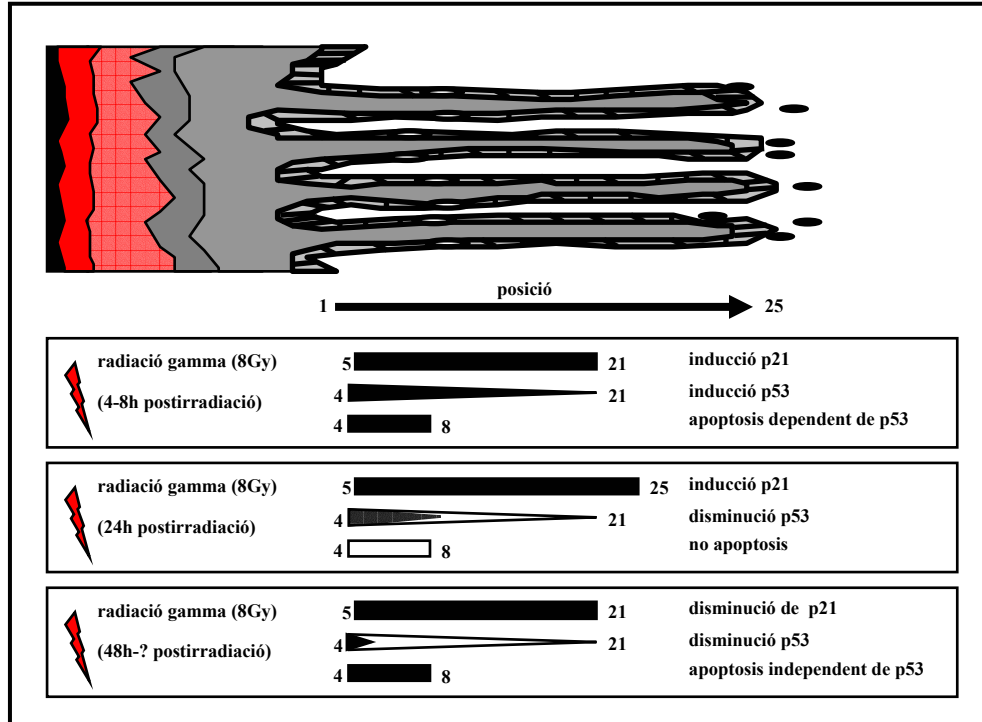
Ni p53 ni p21^{Cip1} es poden detectar en les cèl.lules de les criptes de ratolins no irradiats, però apareixen a 1h i 2h postirradiació, respectivament (409). La distribució de les cèl.lules positives per p53 és més propera a la base de la cripta respecte la distribució de les cèl.lules p21^{Cip1} positives, i la seva detecció és màxima a les 4h postirradiació disminuint gradualment entre les 24 i les 48h, i essent casi absent a les 72h (409).

L'expressió màxima de p21^{Cip1} és a les 24h, desplaçant-se lleugerament en direcció a l'àpex de les vellositats, i a les 72h el marcatge de p21^{Cip1} es mostra altre cop a la part més basal, on es pot observar fins a les 96h (409).

Dividint les cèl.lules p53 positives segons una expressió forta, mitjana o baixa es pot veure que hi ha una distribució diferent d'aquestes. Les cèl.lules amb elevats nivells de p53 4h després de la radiació es concentren prop de la base de la cripta, (posicions 4-8, començant per la base de la cripta), coincidint amb el marcatge posicional de l'apoptosi (409). Tanmateix, la majoria de les cèl.lules apoptòtiques no mostren marcatge per p53, reflectint la pèrdua o l'emascament de l'epítip de l'anticòs durant apoptosi o la ràpida degradació de p53 a través de les caspases (409).

La distribució de les cèl.lules amb una intensitat moderada/baixa de p53 tenen una distribució més centrada o en direcció a l'àpex de la vellositat, i és coincident amb el marcatge de les cèl.lules positives per p21^{Cip1} (posicions 5-21) (409). No hi ha diferències posicionals entre les cèl.lules amb marcatge fort, mitjà i fluix per a p21^{Cip1} (409).

En l'intestí prim la radiació induïx p21^{Cip1} de manera dosi dependent, i a la vegada, dependent de p53, ja que en ratolins deficients per p53 no hi ha una inducció de p21^{Cip1} després de la radiació. En canvi, en l'intestí gruixut la resposta de p53 es veu més atenuada respecte a la observada en l'intestí prim, essent menys les cèl.lules positives per p53 després de la radiació, tot i que aquesta positivitat decau més lentament. El mateix passa per a p21^{Cip1}, essent detectable fins als 6 dies després de la radiació (409). Aquestes dades suggereixen una clara heterogeneïtat en la resposta de diferents poblacions cel.lulars dins el mateix tipus de teixit, en aquest cas l'epiteli intestinal. El dany al DNA causat a una cripta i vellositat és presumiblement el mateix a les cèl.lules més basals i a les més apicals, però la resposta és diferent segons aquest posicionament.



Esquema 2. Posicionament dels enteròcits dins les vellositats quan s'indueix l'expressió de p53, p21^{Cip1} i l'apoptosi a diferents temps postirradiació.

2 Resultats

2.1 Localització de la Ciclina O en les vellositats de l'intestí prim

La determinació de la proteïna Ciclina O per immunohistoquímica en l'intestí prim manifesta una marcatge localitzat només al citoplasma de les cèl.lules més properes a les criptes de les vellositats intestinals (posicions 2-4), mentre que l'expressió no es detecta a les zones mitjanes o apicals (**Figura 1 A i B**).

Amb anterioritat s'ha demostrat que la irradiació *in vivo* induïx l'expressió de p53 i p21^{Cip1}, causant l'apoptosi localitzada d'algunes cèl.lules epitelials de l'intestí prim (409). La Ciclina O també sembla tenir un paper en l'apoptosi, potser com a factor anti o proapoptòtic, ja que en diferents experiments s'ha demostrat l'expressió de la Ciclina O en cèl.lules greument danyades que esdevindran apoptòtiques al cap de poques hores (veure **Capítols 4 i 7, apartat 2.2**). Per estudiar la regulació dels nivells de la Ciclina O i la seva possible implicació en l'apoptosi d'aquest teixit, s'ha estudiat l'expressió de la Ciclina O per immunohistoquímica a diferents temps després de la irradiació *in vivo*.

2.2 Inducció de la Ciclina O dependent d'irradiació en les criptes de l'intestí prim

La radiació gamma (10Gy) *in vivo* causa un increment de l'expressió de la Ciclina O que sembla ser variable en funció del temps postirradiació.

6h després d'irradiar els nivells de la Ciclina O han incrementat i es detecten en un major nombre de cèl.lules de la part basal de la cripta, concretament al citoplasma i a tots els nuclis de les cèl.lules en posició 1-11. Els nuclis positius per la Ciclina O mantenen la morfologia circular, però són clarament més petits i compactes que els nuclis negatius. En algunes vellositats s'observen cèl.lules pròximes a les posicions 7-8 que no estan afectades per la radiació. Aquestes es mantenen negatives per la Ciclina O enmig de les cèl.lules positives veïnes (**Figura 1 C i D**).

Els nivells de la Ciclina O semblen disminuir 1 dia després de la irradiació. Aquesta disminució comporta una baixada dels nivells de proteïna i una reducció en el número de cèl.lules positives, localitzades ara a les posicions 1-7. Aquestes cèl.lules mostren uns nivells de Ciclina O similars als nivells fisiològics sense irradiar i els nuclis no semblen estar afectats (**Figura 1 E i F**).

Curiosament, 3 dies postirradiació sembla haver-hi una segona onada d'expressió de la Ciclina O recuperant l'expressió a les posicions 1-11. La intensitat d'aquesta segona onada d'expressió sembla inferior a l'expressió observada a les 6h postirradiació, però es recupera la positivitat de la Ciclina O en alguns nuclis i aquests, mostren una morfologia més petita i compacta que els negatius (**Figura 1 G i H**).

L'expressió de la Ciclina O en totes les condicions sembla deguda principalment als enteròcits, ja que les observacions per microscopia òptica realitzades fins al moment no mostren expressió en altres tipus cel.lulars que comparteixen la mateixa localització, com podrien ser les cèl.lules caliciformes.

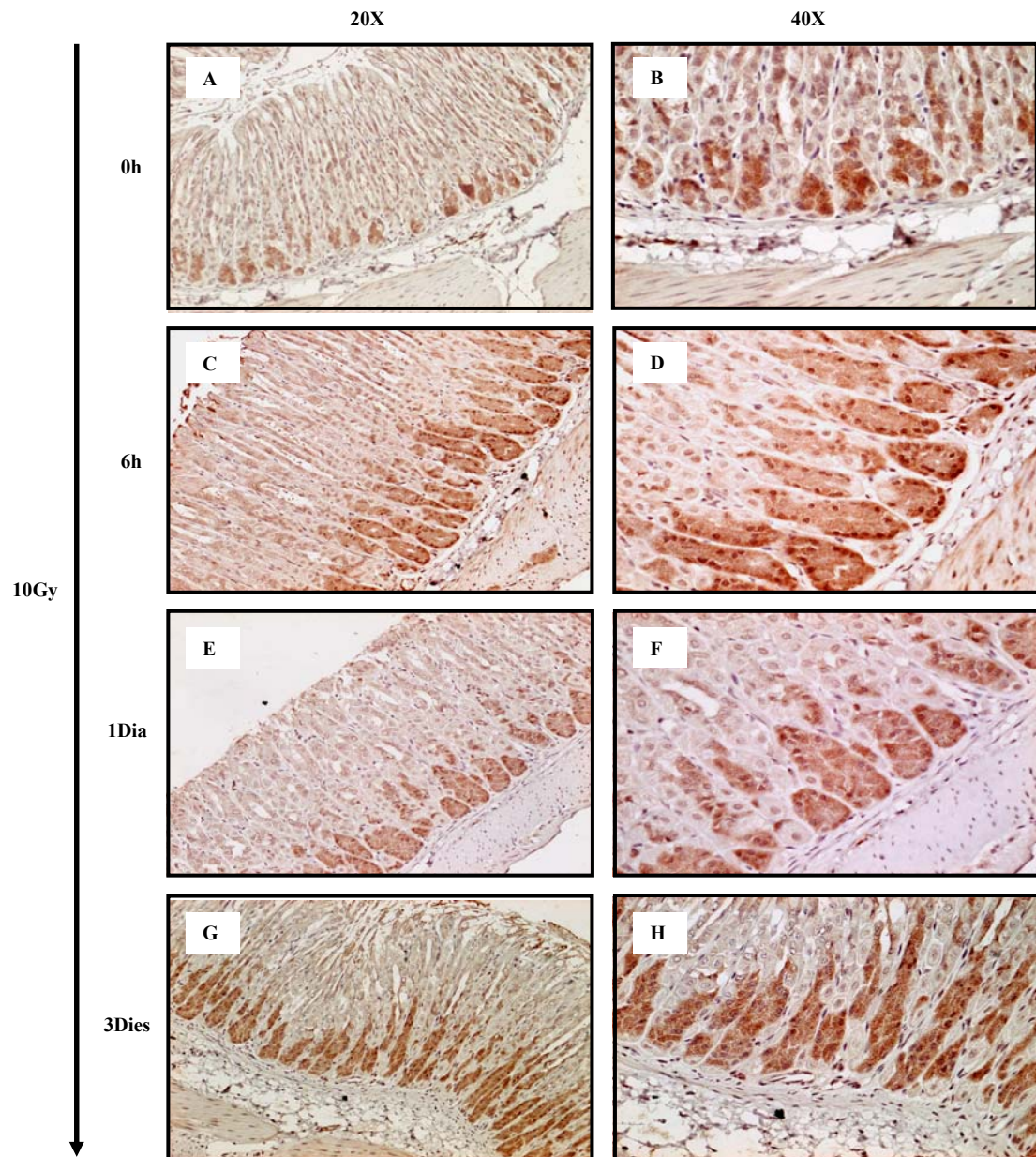


Figura 1. Inducció de l'expressió de la Ciclina O dependent d'irradiació en intestí prim. Detecció de la proteïna Ciclina O per immunohistoquímica en intestí prim i la seva cinètica d'inducció localitzada després d'irradiació (10Gy). Expressió fisiològica de la Ciclina O a la zona basal de les vellositats de l'intestí prim (A i B) i inducció de la Ciclina O a les 6h (C i D), 1 dia (E i F) i 3 dies (G i H) postirradiació

3 Discussió

En l'intestí prim la presència de p53 és indetectable en condicions normals, però a les 4h postirradiació (8Gy) hi ha un increment de l'expressió de p53 i la distribució de les cèl.lules amb els nivells més elevats d'aquesta proteïna, posicions 4-8, coincideix amb l'aparició de l'apoptosi (62,243).

En condicions normals la Ciclina O és detectable a les posicions 2-4 de les vellositats intestinals, però a les 6h postirradiació (10Gy) la presència de la Ciclina O s'expandeix ocupant les posicions 1-11 i coincideix amb p53 i l'aparició de l'apoptosi a les posicions 2-8. Les condicions descrites per la inducció de p53 són molt similars a les usades en el nostre cas per la inducció de la Ciclina O i comprenen la primera onada d'apoptosi descrita entre les 4h i les 8h postirradiació. Aquests resultats suporten la hipòtesi d'una expressió basal de la Ciclina O en condicions normals independent de p53 (posicions 2-4) i la inducció de l'expressió del gen *ciclina O* per p53 *in vivo* després de la irradiació, suggerint un paper d'aquesta ciclina com a element proapoptòtic dependent de p53 en l'epiteli intestinal de ratolí.

p21^{Cip1} també és un gen diana de p53, però la seva distribució, a les posicions 5-21, és molt més apical i homogènia que la de p53 (409). La distribució de les cèl.lules amb una intensitat moderada/baixa de p53, a les posicions 9-21, es correspon posicionalment amb les cèl.lules que són positives per *p21^{Cip1}* i que a la vegada mostren una freqüència baixa d'apoptosi després de 4h postirradiació (8Gy) (409). A la vegada, els tractaments amb radiació gamma de cèl.lules humanes colorectals tumorals HCT116 amb p53 funcional indueixen una aturada del cicle cel.lular, mentre que clons d'aquestes amb *p21^{Cip1}* no funcional pateixen apoptosi pels mateixos estímuls (417).

Així, s'ha demostrat que hi ha una associació entre l'expressió de *p21^{Cip1}* i l'atenuació de l'apoptosi, tot i que altres estudis mostren com la sobreexpressió de p53 exògen en línies tumorals pot induir apoptosi independentment dels nivells de *p21^{Cip1}* (57,302). Aquests resultats suggereix un paper antiapoptòtic de *p21^{Cip1}* quan els nivells de p53 són baixos, i indiquen que els nivells de p53 activa després de la radiació marquen el destí de cada cèl.lula.

Segons aquestes evidències empíriques, el solapament posicional de l'expressió de la Ciclina O i p53 a les 6h postirradiació es dona a les cèl.lules més sensibles a patir apoptosi dependent de p53, mentre que la Ciclina O no es detecta a les cèl.lules que expressen quantitats intermitges de p53 i que mantenen l'expressió de *p21^{Cip1}*, (posicions 9-21), suggerint una funció proapoptòtica de la Ciclina O.

Alguns estudis indiquen que p53 té diferent afinitat pels promotors dels seus gens diana, i per tant, la regulació d'aquests gens serà diferent dependent dels nivells de p53 en un moment donat (57,209,313). p53 sembla tenir una elevada afinitat pel promotor de *p21^{Cip1}*, ja que aquesta proteïna és capaç d'expressar-se tant en condicions d'elevats nivells de p53, (posicions 4-8 de les criptes intestinals), com en condicions de baixos nivells de p53, (posicions 9-21). Els elevats nivells de p53 es donen a les cèl.lules que esdevindran apoptòtiques, i per tant, els promotors dels gens proapoptòtics dependents de p53 semblen tenir més baixa afinitat (57). Aquest sembla ser el cas del promotor del gen de la Ciclina O, ja que la inducció d'aquesta proteïna correlaciona amb les cèl.lules que expressen nivells més elevats de p53.

Dosis menors de radiació (ex: 1Gy) indueixen una resposta dependent de p53 menor (243), indicant que els mecanismes de reparació de DNA són suficients per

reparar el dany causat a la cèl.lula evitant la seva mort, o que els sensors per iniciar la mort independent de p53 s'activen a nivells més elevats de dany. Aquestes dades indiquen que la resposta de p53 és dosi dependent, fet que podria explicar la inducció de la Ciclina O dependent de p53 després d'irradiacions fortes (10Gy) a les posicions 1-3 i 9-11, on no s'ha descrit la inducció de p53 en dosis menors.

En aquestes condicions la detecció de p53 és màxima a les 4h postirradiació i mostra una decaiguda gradual entre les 24 i les 48h, essent casi absent a les 72h. La conseqüent onada de mort dependent de p53 és màxima entre les 4-8h després d'irradiació, i decau a les 24h coincidint amb la devallada de p53. En canvi, l'expressió de p21^{Cip1} dependent de p53 és màxima a les 24h, però es pot detectar fins a les 96h a les posicions 5-21 (244).

Estudis a temps llargs indiquen que hi ha una mort tardana, induïda només per elevades dosis d'irradiació (8Gy), en les cèl.lules epitelials de l'intestí prim dels ratolins deficients per p53 (243). Aquesta mort comença a les 24h i perdura a les 40h, tot i que es manté estable i no assoleix 50% de l'apoptosi p53 dependent.

Per microscopia electrònica s'ha observat que la morfologia d'aquestes cèl.lules apoptòtiques p53 negatives té similituds a les cèl.lules mitòtiques, ja que tenen el doble de volum que les cèl.lules normals i contenen diferents fragments de cromatina condensada al nucli (243).

En els nostres experiments s'ha detectat una pèrdua de l'expressió de la Ciclina O a la base de les criptes a les 24h postirradiació, corroborant la dependència d'elevats nivells de p53 per a la seva expressió. Malgrat tot, a temps més llargs hi ha una segona onada d'expressió de la Ciclina O detectada a la base de les criptes als 3 dies postirradiació. Aquesta expressió tardana és coetània amb l'apoptosi independent de p53 i dependent d'elevades dosis d'irradiació descrita a les 40h.

Aquesta segona onada apoptòtica és més important en els animals deficients per p53 i, tot i que és a través d'un mecanisme desconegut, podria estar mediada per proteïnes de la família de p53. En alguns casos on es perd la funció de p53 altres membres de la seva família, com p73 (109), poden adquirir les funcions de p53 encara que de manera menys eficient (243). Aquest mecanisme alternatiu representa una segona barrera de defensa de l'organisme, donant més oportunitats a l'eliminació de cèl.lules danyades potencialment oncogèniques. Aquesta segona onada apoptòtica és quantitativament menor comparada amb la primera, i l'expressió de la Ciclina O també sembla ser més baixa i afectar a menys nuclis respecte la mort dependent de p53 a les 6h postirradiació. Malgrat tot, els estudis amb microscopia òptica realitzats fins al moment no semblen indicar la presència de cèl.lules amb un volum citoplasmàtic anormal ni condensacions cromosòmiques més pròpies de cèl.lules en mitosi.

Ni p53 ni p21^{Cip1} es poden detectar a les cèl.lules epitelials de l'intestí prim de ratolins no irradiats (409). Si p53 té baixa afinitat pel promotor de la Ciclina O, una alternativa per explicar l'expressió d'aquesta proteïna en condicions normals podria ser la seva regulació per altres membres de la família de p53. Un membre d'aquesta família a tenir en compte és p73, ja que també actua com a factor de transcripció i pot compartir la regulació d'alguns gens diana amb p53 (109). Així, p73 podria ser el responsable de l'expressió de la Ciclina O a l'intestí en condicions normals i en la segona onada als 3 dies després de la radiació. Recentment hem observat que en l'intestí de ratolins deficients per p53 hi ha expressió de la Ciclina O indicant que almenys, l'expressió en

condicions normals a l'intestí dels ratolins adults és independent de p53 (resultats no mostrats).

A partir de la divisió mitòtica de les cèl.lules mare, localitzades a posicions properes a la cripta intestinal, els enteròcits migren cap amunt i cap avall amb el cicle cel.lular aturat i destinats a patir la mort cel.lular. Les cèl.lules en contacte amb la llum de l'intestí degeneren a causa de les agressions físiques i químiques i les seves restes seran eliminades a través de la llum intestinal per descamació. Per contra, les cèl.lules que migren en direcció a la cripta no estan en contacte amb agents externs que comprometin la seva viabilitat, però igualment han de ser eliminades per mecanismes de mort cel.lular programada per tal de mantenir l'equilibri funcional de la vellositat intestinal. Aquest equilibri entre la regeneració prop de les criptes, la migració cap amunt i cap avall, i la mort cel.lular en els dos extrems permet mantenir una llongitud constant de cada vellositat de l'intestí prim en unes 25 cèl.lules.

A diferència dels queratinòcits en la seva migració cap a l'exterior (veure **Capítol 9, apartat 3.4**), els enteròcits que van en direcció a la llum intestinal també deixen de proliferar però mantenen la seva viabilitat fins l'últim moment. Aquests enteròcits apicals no tenen només una funció física de sustentació, sinó que a diferència de les cèl.lules escamoses de l'epidermis, s'han de mantenir metabòlicament actius per dur a terme funcions d'absorció i digestió. Aquesta diferència amb els queratinòcits podria explicar perquè en el cas dels enteròcits apicals no es detecta la presència de la Ciclina O.

Quan els enteròcits entren en contacte amb la llum intestinal encara són viables, però l'agressió física, les secrecions àcídiques estomacals i els enzims pancreàtics actuen malmetent la integritat cel.lular. Aquests fenòmens suggereixen que els enteròcits apicals moren per processos que probablement no requereixen d'una mort programada genèticament ni de l'expressió de la Ciclina O, ja que la mort es pot produir per l'agressió massiva dels agens externs. Així, l'àpex de les vellositats s'observen les restes cel.lulars que es desprenen i són eliminades pel tracte intestinal sense expressió de la Ciclina O.

Les cèl.lules que van en direcció a la cripta intestinal no proliferen i en el seu curt recorregut en direcció contrària a la llum intestinal no desenvolupen una funció d'absorció i digestió com els enteròcits que migren apicalment. A diferència dels enteròcits que migren apicalment, els que migren cap a la cripta expressen nivells elevats de la Ciclina O i el seu destí més probable és la mort cel.lular programada per tal de regular l'equilibri funcional i el creixement de les vellositats intestinals.

Aquest resultat fa pensar que la Ciclina O en aquestes cèl.lules pot induir la seva mort per apoptosi a la cripta evitant el creixement incontrolat de les vellositats. Així, l'expressió de la Ciclina O als enteròcits basals podria tenir similituds amb l'expressió d'aquesta proteïna a les cèl.lules de l'epidermis (veure **Capítol 9, apartat 3.4**), i fa molt probable la seva participació en l'apoptosi. En ambdós casos la Ciclina O s'expressa a nivells elevats al citoplasma de les cèl.lules provinents de les mitosis de les cèl.lules mare. Aquestes cèl.lules filles expressen la Ciclina O al mateix temps que aturen la seva proliferació i degeneren al final de la seva migració.

Seria interessant determinar els factors que influeixen en els diferents nivells de p53 de les diferents cèl.lules epitelials de l'intestí, ja que com s'ha vist, el mateix dany pot causar una inducció i una resposta específica segons la seva posició a la base de la

cripta, a les zones intermitges o a l'àpex de la vellositat. Els factors que determinen l'expressió, l'estabilitat i l'activació de p53 s'ha vist que poden ser molt variats en altres tipus cel.lulars; des de la sensibilitat dels sensors que detecten el dany al DNA, passant per la eficiència en la transducció de la senyal, fins als pròpis nivells de l'mRNA de p53 (136,191). Així, la quantitat de p53 activa i la seva taxa de degradació a través de Mdm2 i/o altres proteïnes podrien determinar el futur de les cèl.lules intestinals segons la seva posició.

La proliferació a les criptes de l'intestí gruixut és més lenta que en l'intestí prim (un cicle cel.lular dura 12h i 35h respectivament). Això vol dir que el número de cèl.lules que sintetitzen DNA en un moment donat és de dues a tres vegades més gran que en les cèl.lules de l'intestí prim en comparació amb l'intestí gruixut. A la vegada, les criptes de l'intestí gruixut són més llargues que les criptes de l'intestí prim (45 i 25 cèl.lules respectivament), fent que la migració a través de les criptes també sigui més lenta (306). Això fa que probablement el dany al DNA es detecti més ràpidament a l'intestí prim, mostrant uns nivells més elevats i unes cinètiques d'activació de p53 més ràpides que a l'intestí gruixut. Malgrat tot, res fa pensar que l'expressió i la funció de la Ciclina O no es mantinguin en aquesta altra part del sistema digestiu. Per estudiar més a fons la implicació de la Ciclina O en l'apoptosi del sistema digestiu caldrà determinar si l'expressió d'aquesta ciclina implica la mort per apoptosi de la cèl.lula, i si la regulació d'aquests dos fenòmens consecutius està regulada per l'activació de p53, de p73 (109), o altres factors de transcripció.

Capítol 6. Expressió de la Ciclina O al pulmó

1 Introducció

1.1 Estructura interna del pulmó

L'organització interna del pulmó està formada per bronquis d'estructura cartilaginosa similar a la de la tràquea. Aquests bronquis primaris disminueixen en diàmetre en el seu transcurs, a mesura que també varia la seva estructura. El canvi d'estructura comporta el pas d'un epitelí estratificat a un epitelí columnar, i la formació d'una capa de teixit muscular llis que envolcalla helicoidalment la làmina pròpia a mesura que substitueix progressivament el cartílag. Aquesta nova capa de teixit muscular permetrà la contracció dels bronquis terciaris, en longitud i en diàmetre, graduant el flux d'aire.

Els bronquis terciaris desenvolupen en estructures encara més petites anomenades bronquiols (**B**). Aquests fan menys d'un milímetre de diàmetre i no tenen cap suport cartilaginós. L'epitelí respiratori dels bronquiols és simple, columnar i ciliat, i com l'epitelí intestinal conté algunes cèl·lules caliciformes. La capa de múscul llis es disposa en espiral, controlant el flux d'aire dins dels bronquiols, d'igual manera que passa amb els bronquis.

La terminació de l'arbre respiratori és en els bronquiols terminals (**T**), les estructures de diàmetre més petit de l'arbre respiratori. L'epitelí dels bronquiols terminals està format per cèl·lules cuboidals de cèl·lules no ciliades, anomenades clara. Aquestes cèl·lules tenen la ultraestructura de cèl·lules secretores, però la composició i la funció dels productes secretats encara no és coneguda.

Cada bronquiol es divideix en diferents passatges anomenats ductes alveolars (**AD**) amb obertures laterals formant els espais anomenats sacs alveolars (**AS**). Els sacs alveolars contenen estructures úniques dedicades pròpiament a l'intercanvi de gasos, anomenades alvèols (**A**). Cada alvèol és com una butxaca oberta només en un sentit i formada per cèl·lules epitelials extremadament planes. Al voltant d'aquests alvèols hi ha una rica xarxa de capilars i vasos pulmonars (**V**) que segueixen les vies aèries. Entre els alvèols hi ha les parets o *septum alveolar*, formades per cèl·lules epitelials extremadament planes i delicats capilars i elements elàstics. Aquests *septum alveolar* contenen minúscules obertures, anomenades porus alveolars, amb la funció de contrarestar la pressió quan un bronquiol és obstruït.

Les parets alveolars estan formades per tres components;

1-L'epitelí, format per cèl·lules epitelials estirades amb nuclis aplanats anomenades pneumòcits (P1) i cèl·lules epitelials rodones amb nuclis circulars anomenades pneumòcits (P2). Les primeres es creu que intervenen en l'intercanvi gasós, mentre que les segones secreten surfactant per reduir la tensió superficial entre els alvèols.

2-El teixit connectiu forma una capa de suport de les parets alveolars i dels capilars sanguinis formada per fibres elàstiques de col·lagen amb alguns fibroblasts.

3-Vasos sanguinis, principalment capil·lars de fins a 10 micres de diàmetre que poden estar en íntim contacte amb les cèl·lules epitelials o bé suportades pel teixit connectiu.

A les parets alveolars, o fins i tot lliures als espais alveolars, es poden trobar fagòcits provinents dels monòcits circulants, anomenats macròfags alveolars, que contenen material fagocitat. Aquestes cèl.lules conformen un mecanisme de defensa que elimina els elements residuals de l'aire que poden estar retinguts en les parets alveolars (406).

2 Resultats

2.1 Expressió de la Ciclina O en l'epiteli bronquial i als components de les parets alveolars

Després dels testicles, el pulmó és el teixit on el gen de la Ciclina O mostra una expressió més elevada en el ratolí adult.

La detecció de la Ciclina O, per immunohistoquímica, mostra un marcatge generalitzat en tot el teixit. Els nivells més elevats es troben al citoplasma de les cèl.lules que conformen l'epiteli dels bronquiols i bronquiols terminals (**Figura 1 A i B**), però també a moltes de les cèl.lules que integren el parènquima pulmonar, concretament a les parets alveolars. Als *alveolar septum* hi ha un marcatge preferentment nuclear, a nuclis de morfologia circular i aplanada de diferents tamanys (**Figura 1 A, B i C**).

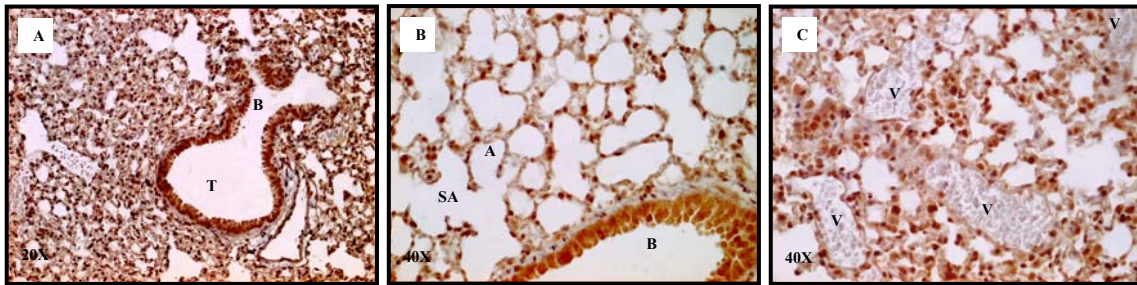


Figura 1. Expressió de la Ciclina O al pulmó
(T, bronquiol terminal; B, bronquiol; SA, sac alveolar; A, alvèol; V, vasos sanguinis)

3 Discussió

En diferents estudis del parènquima pulmonar s'ha demostrat que després de la inducció de dany genotòxic hi ha una resposta apoptòtica (16,64). En concret, els gasos i fums que contenen metalls com el Fe, el Cr i el Ni poden generar radicals lliures a les cèl.lules pulmonars (13-15). El Cr (IV) és permeable a la membrana plasmàtica de manera dosi dependent a partir de baixes concentracions (217), i un cop dins la cèl.lula és reduït generant espècies reactives de l'oxigen que podran causar lesions al DNA (367). Si aquestes lesions són greus i es tradueixen en trencaments de la doble cadena les cèl.lules pulmonars aturen el cicle cel.lular i es moren per apoptosi (72,280). Així, determinant l'apoptosi pel trencament de DNA en el parènquima pulmonar s'observa una resposta dosi dependent en resposta a l'exposició de Cr (VI) (16).

L'aparell circulatori està permanentment exposat a diferents fonts d'oxidants tant internes com externes. En condicions d'hiperòxia s'ha demostrat que al pulmó hi ha un increment important en els nivells de la proteïna p53 i del seu gen diana $p21^{Cip1}$ a les 48h d'exposició, tant a l'epiteli bronquial com al pulmonar (72,281). Experiments en ratolins deficientes per p53 demostren que l'absència d'aquest factor no afecta a l'increment de $p21^{Cip1}$ en el teixit pulmonar després de patir estrès oxidatiu (281). A la vegada, en els ratolins deficientes per $p21^{Cip1}$ s'observa una devallada de la supervivència dels animals d'un 40% associada a un increment del trencament del DNA i de l'apoptosi pulmonar (281).

El gen $p21^{Cip1}$ pot ser regulat per diferents factors diferents de p53 com per exemple; factors de creixement, de diferenciació i citoquines que podrien explicar el seu increment en condicions d'hiperòxia independentment de p53. Després del tractament d'estrès oxidatiu s'ha vist que en els animals salvatges $p21^{Cip1}$ exerceix un efecte de retard en la replicació de les cèl.lules pulmonars que és absent en els animals $p21^{Cip1}$ KO (72).

En conjunt aquestes dades suggereixen que $p21^{Cip1}$ té un efecte protector de l'apoptosi pulmonar, possiblement a través d'un retard en la replicació afavorint l'actuació dels mecanismes reparadors del DNA. Per contra, els nivells de $p27^{Kip1}$ pulmonars no es veuen alterats en condicions d'hiperòxia.

L'expressió de la Ciclina O a l'epiteli bronquial s'observa en estadis embrionaris i es manté quan l'individu és adult. Pel que fa al parènquima pulmonar adult, a les parets alveolars hi ha dos tipus cellulars que s'adiuen al tipus de marcatge observat en la Ciclina O. Les cèl.lules epitelials o pneumòcits (P1 i P2) són cèl.lules estirades i amb nuclis aplanats o rodones i amb nuclis circulars, respectivament, que podrien ser les responsables de la presència generalitzada d'aquesta proteïna a tot el parènquima pulmonar.

A causa del seu contacte constant amb l'exterior el teixit pulmonar podria estar expressant constantment la Ciclina O i potenciar la degeneració i el recanvi de les cèl.lules afectades pel contacte amb els agents contaminants del medi.

Els nivells aparentment baixos però constants de la Ciclina O després d'experiments d'irradiació *in vivo* (resultat no mostrat), suggereixen una regulació de l'expressió d'aquesta proteïna independent de p53 en el teixit pulmonar. Seria interessant estudiar si en condicions d'hiperòxia la inducció protectora de $p21^{Cip1}$ va igualment acompanyada d'una inducció posterior de la Ciclina O. Aquesta seria capaç d'induir apoptosi a les

cèl.lules greument lesionades que no han pogut reparar el dany al DNA. Al mateix temps, si l'acció apoptòtica de la Ciclina O és a través de l'activació de Cdk2, com suggereixen alguns experiments (veure **Capítol 2, apartat 1.1**), la inducció de l'inhibidor p21^{Cip1} en hipòxia també podria estar retardant transitòriament l'acció apoptòtica de la Ciclina O a la vegada que atura el cicle cel.lular per permetre la reparació i evitar la propagació del dany genotòxic a les cèl.lules filles. Finalment les cèl.lules reparades recuperen els nivells basals de p21^{Cip1} i el seu genoma deixa de senyalitzar la inducció d'apoptosi, probablement bloquejant la inducció de la Ciclina O. Per contra, el dany al DNA que no s'ha pogut reparar segueix induint l'apoptosi de les cèl.lules greument afectades a través de l'expressió de la Ciclina O, aconseguint nivells d'activació de Cdk2 que podrien sobreposar-se a la inhibició de p21^{Cip1}. L'activitat del complex Cdk2-Ciclina O en aquestes condicions podria iniciar el procés apoptòtic eliminant les cèl.lules danyades del pulmó.

Capítol 7. Expressió de la Ciclina O al testicle

1 Introducció

1.1 La primera divisió meiótica

La primera profase meiótica, o profase I, es divideix en cinc etapes seqüencials: leptotè, zigotè, paquitè i diacinesi (**Esquema 1**).

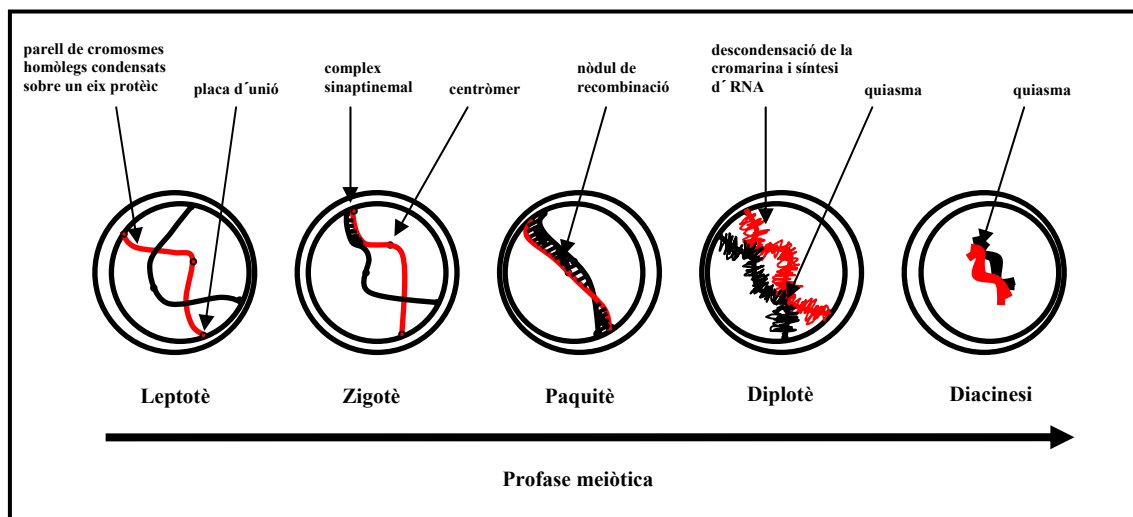
Durant el leptotè cada cromosoma bivalent, o duplicat, es condensa formant un fil al voltant d'una estructura proteica i s'uneix en els seus extrems a l'envoltura nuclear a través d'un complex denominat placa d'unió.

En el zigotè hi ha un aparellament íntim entre els dos cromosomes homòlegs que comença pels extrems units a l'envolcall nuclear i continua cap al centre. En forma de cremallera s'afegeixen estructures que connecten els dos eixos proteics, formant el que s'anomena complex sinaptnemal entre les cromàtides de dos cromosomes homòlegs bivalents. D'aquesta manera es creu que cada gen queda juxtaposat al gen homòleg del cromosoma oposat.

El paquitè comença així que el complex sinaptnemal s'ha format. Aquesta etapa persisteix durant dies, apareixent estructures proteiques, denominades nòduls de recombinació, al centre de la "cremallera". Aquests nòduls es creu que propicien l'intercanvi cromosòmic entre cromàtides no germanes, fent que cada cromosoma de les cèl·lules filles contingui material genètic patern i matern.

En el diplotè el complex es desfà, procés denominat desinapsi. És en aquest punt que els quiasmes o punts de recombinació es fan visibles. Els cromosomes es descondensen i es dona la síntesi de mRNA.

Finalment, la diacinesi és l'etapa de transició a la metafase, on s'ha aturat la síntesi de mRNA i els cromosomes es condensen augmentant de gruix i separant-se totalment de l'embolcall nuclear. Cada cromosoma bivalent manté les seves cromàtides germanes unides pel centròmer i les no germanes pels quiasmes (5).

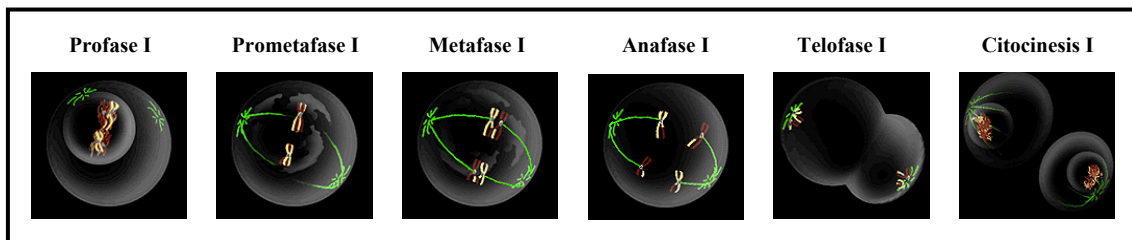


Esquema 1. Etapes en la progressió de la profase I meiótica

Després de la llarga profase I descrita la meiósi continua per etapes similars a la mitosi (**Esquema 2**). A la prometafase I desapareix la membrana nuclear i els

cromosomes units per les fibres de microtúbuls a través del cinetocor es comencen a posicionar. S'anomena metafase I quan els cromosomes bivalents es posicionen al centre de la cèl.lula amb una alineació aleatòria, però amb cada homòleg enfrontat amb el seu corresponent. Això vol dir que cada cèl.lula filla tindrà un 50% de probabilitats de rebre el cromosoma homòleg del pare o de la mare. A l'anafase I els quiasmes es desfan i cada cromosoma homòleg es separa cap a un pol diferent. A la telofase cada joc de cromosomes ha arribat al pol oposat de la cèl.lula i aquesta es divideix durant la citocinèsi, formant cèl.lules diploides que començaran ràpidament la segona divisió meiótica.

Mentre en la mitosi cada cromosoma prèviament duplicat es divideix pel cinetocor (centròmer) alliberant dues cromàtides germanes idèntiques que migren separatament cap a extrems oposats de la cèl.lula, a la primera divisió meiótica no hi ha separació de les cromàtides i per tant, cada cromosoma replicat migra a extrems oposat del seu homòleg. Així, al final de la primera divisió meiótica cada cèl.lula filla diploide conté dues cromàtides del mateix cromosoma unides pel cinetocor ($2n$), però els cromosomes homòlegs provinents del pare o de la mare ja s'han separat (5).



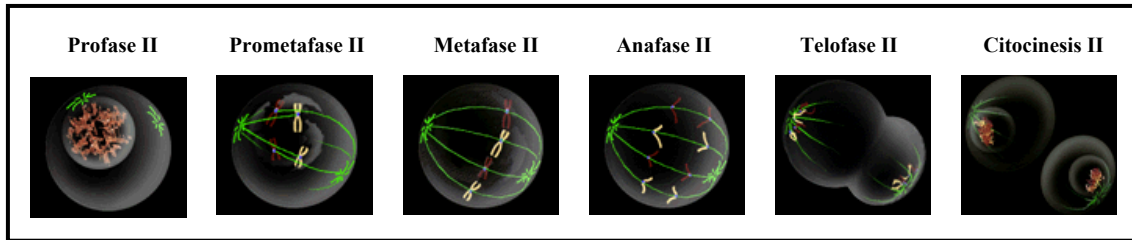
Esquema 2. Etapes de la primera divisió meiótica.

1.2 La segona divisió meiótica

La segona divisió meiótica és idèntica a la mitosi amb l'excepció de dues diferències importants; no hi ha hagut una duplicació prèvia de DNA, ja que en aquest cas les cèl.lules diploides provenen de la primera divisió meiótica, i degut als quiasmes entre cromosomes homòlegs del pare i de la mare les cromàtides germanes no tenen un contingut idèntic d'informació genètica.

A la profase II la cromatina es condensa, el nucleol de la cèl.lula desapareix i els centriols es posicionen a cada pol de la cèl.lula. A la prometafase II es desfà l'envoltura nuclear, els feixos de microtúbuls s'uneixen al centròmer dels cromosomes i aquests es comencen a situar centralment a la cèl.lula. A la metafase II els feixos de microtúbuls posicionen els cromosomes alineats formant la placa metafàsica. La formació de la placa metafàsica facilita que cada nou nucli contingui una còpia de cada cromosoma.

A l'anafase II es separen les cromàtides germanes, però no idèntiques, i migren cap a pols oposats de la cèl.lula. A la telofase II les cromàtides es situen als pols i es comença a formar una nova envoltura nuclear al mateix temps que els cromosomes es descondensen i els microtúbuls es dispersen. Finalment, a la citocinèsi un anell d'actina estreny la membrana citoplasmàtica formant dues cèl.lules filles haploides (**Esquema 3**).



Esquema 3. Etapes de la segona divisió meiótica

Així, una sola cèl·lula germinal haploide masculina es fusionarà amb una cèl·lula germinal haploide femenina formant una cèl·lula diploide. A partir d'aquesta cèl·lula diploide totipotent es formarà un organisme sencer amb un conjunt de cèl·lules formadores de la línia germinal. Cadascuna d'aquestes cèl·lules generarà quatre gàmetes haploides per meiosi. En el mascle cadascun d'aquests quatre gàmetes formarà espermatozoides madurs a través de diferents canvis morfològics, mentre en la femella una distribució desigual del citoplasma durant la meiosi formarà un òvul amb la major part del citoplasma i tres cèl·lules més, anomenats cossos polars (5).

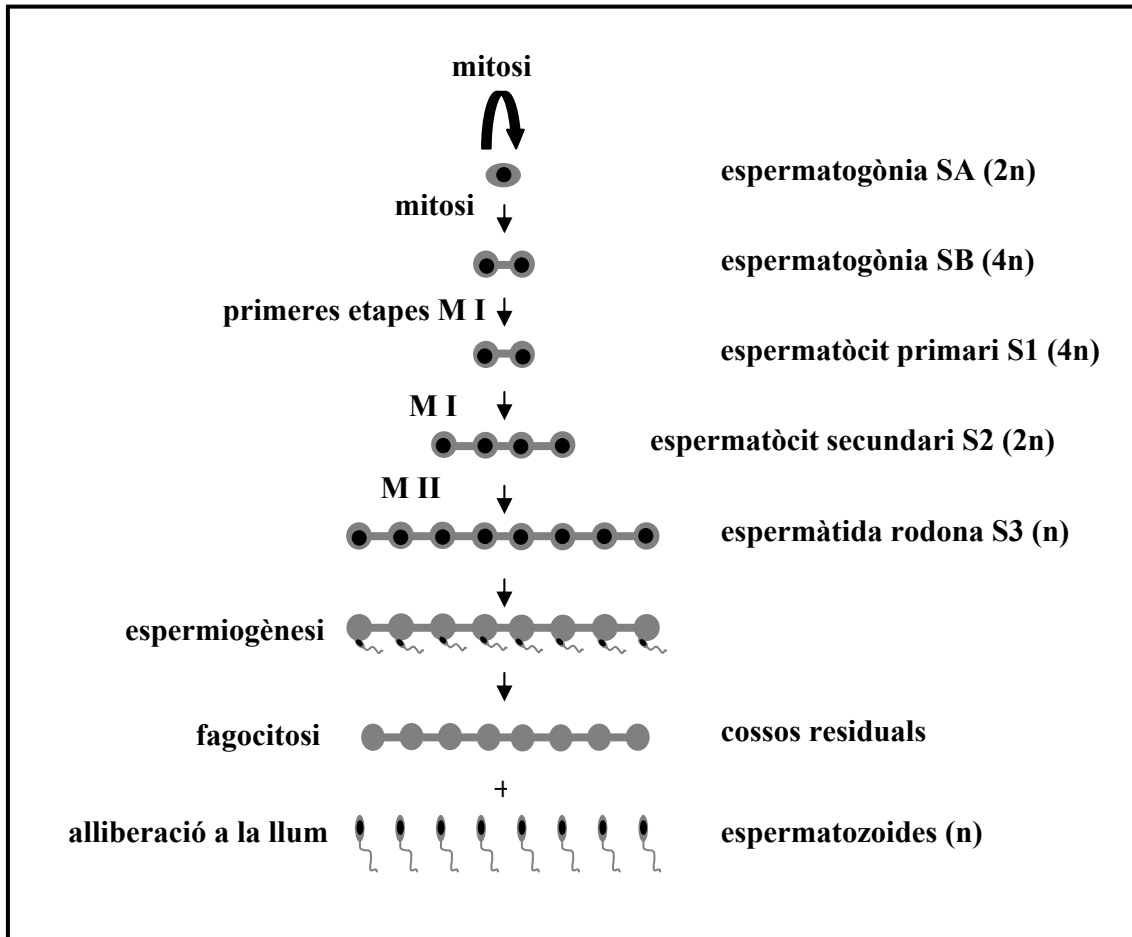
1.3 Introducció a l'espermatogènesi i a l'espermiogènesi

Les primeres cèl·lules germinals masculines, anomenades espermatogònies, estan presents en petites quantitats en les gònades sexuals masculines, els testicles, abans de la maduració sexual. Després de la maduració sexual, les espermatogònies es multipliquen continuament per mitosi formant un pool de cèl·lules preparades per donar lloc a les gàmetes sexuals per meiosi, procés conegut com espermatogènesi. Les gàmetes sexuals formades hauran de madurar fins a espermatozoides mòbils, procés conegut amb el nom d'espermiogènesi. Ambdós processos es donen al testicle. **(Esquema 4)**

En l'espermatogènesi les espermatogònies diploides resideixen a la membrana basal de l'epiteli seminífer, dividint-se per mitosi donant lloc a futures espermatogònies (tipus **SA**) o a espermatogònies (tipus **SB**). Les del tipus **SA** tenen un nucli esfèric o el·líptic gran amb una lleugera condensació de la cromatina, un nucleol associat a l'envolta nuclear i vacuoles nuclears. Les del tipus **SB** tenen un nucli menys condensat, un nucleol central i no tenen vacuoles. En ambdós, el citoplasma és petit. Mentre la línia d'espermatogònies tipus **SA** es manté per mitosi, les del tipus **SB** entren en divisió meiótica en l'estadi conegut com espermatòcits primaris (**S1**). Aquests es reconeixen per l'extens citoplasma i nuclis grans que poden estar en divisió cromosòmica (en humans la MI tarda unes tres setmanes), donant lloc als espermatòcits secundaris (**S2**). Aquests es veuen amb menys freqüència, ja que són més petits i ràpidament pateixen la segona divisió meiótica. Les gàmetes haploides d'aquesta segona divisió s'anomenen espermatides (**S3**), tenen un nucli circular i començaran la metamorfosi coneguda amb el nom d'espermiogènesi. A mesura que la espermiogènesi avança, el nucli de les cèl·lules esdevé més compacte i allargat i menys granular, fins arribar a les espermatozoides mòbils flagelades (**S4**) ja en contacte amb la llum del tub seminífer.

Durant l'espermatogènesi i l'espermiogènesi les cèl·lules filles de cada divisió romanen connectades entre elles per ponts citoplasmàtics. Així, cada sèrie espermàtica

és un gran sincici, ja que les cèl.lules comparteixen un citoplasma comú que permet difondre els productes del genoma i que només es trencarà amb l'alliberament dels espermatozoides a través de la llum del tub seminífer. Per tant, les cèl.lules germinals masculines no completen la citocinesi de la meiosi fins que han madurat completament els espermatozoides, fet que explica la sincronia de la producció d'espermatozoides en qualsevol etapa del tub seminífer.

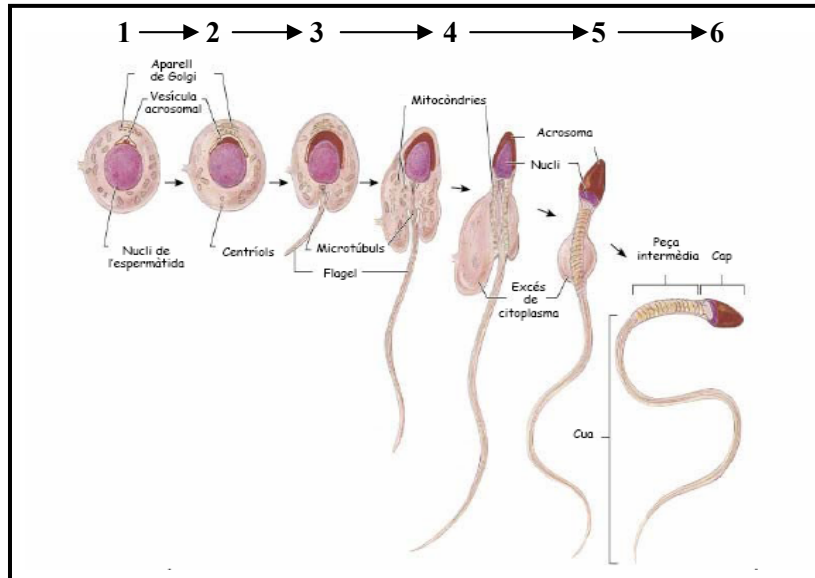


Esquema 4. Representació de les diferents etapes de l'espermatogènesi.

L'espermiogènesi és el procés pel qual les espermàtides rodones produïdes per la divisió meiòtica es transformen en cèl.lules mòbils, els espermatozoides madurs. L'espermiogènesi engloba diferents canvis (**Esquema 5**);

1. L'aparell de Golgi forma una vesícula, anomenada acrosoma, que conté carbohidrats i enzims hidrolítics.
2. L'acrosoma es situa a un pol del nucli cada vegada més allargat.
3. Els dos centriols es situen al pol oposat a l'acrosoma, i el centriol aliniat amb l'eix del nucli allargat formarà un flagel.

4. El citoplasma s'exten per donar cabuda al flagel que s'està formant i acumula les mitocondries en una disposició helicoidal al voltant de la primera part de l'extensió flagel·lar.
5. L'excés de citoplasma formarà els anomenats cossos residuals i seran fagocitats a través del citoplasma de les cèl·lules de Sertoli en contacte amb la llum del tub seminífer.
6. Quan els espermatozoides són emmagatzemats i acumulats a l'epidídim el seu flagel adquireix mobilitat, finalitzant el procés de maduració o espermiogènesi.



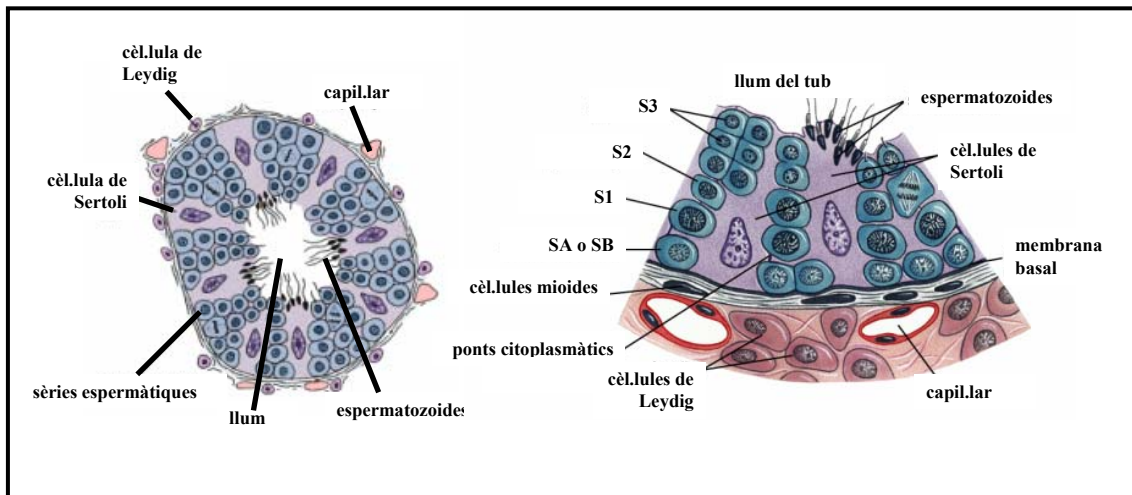
Esquema 5. Etapes de l'espermiogènesi

Les cèl·lules de Sertoli tenen un nucli gran i allargat en angle recte a la membrana basal del tub seminífer, una cromatina homogènia i un nucleol prominent central. (**Esquema 6**). Aquestes cèl·lules es situen al voltant de l'epiteli seminífer i entre les espermatogònies, però el seu citoplasma allargat i ramificat arriba fins a la llum del tub seminífer i connecta amb totes les sèries espermàtiques, ajudant el seu desenvolupament. Això fa que el citoplasma de les cèl·lules Sertoli sigui molt irregular i constantment canviant per permetre el desenvolupament i la progressió de les sèries espermàtiques cap a la llum. El seu citoplasma conté un nombre moderat de mitocondries, bastantes gotes lipídiques i relativament poc reticle endoplasmàtic rugós, suggerint una elevada biosíntesi lipídica. Així, les cèl·lules de Sertoli es creu que són com les cèl·lules “mainadera” de les sèries espermàtiques, proveïnt-les estructural i metabòlicament, i al final de l'espermiogènesi s'encarregaran de fagocitar l'excés de citoplasma de les espermàtides, els anomenats cossos residuals (406).

A diferència dels oòcits, els espermatozoides experimenten part de la seva diferenciació després que els nuclis hagin acabat la meiosi, ja que en l'espermiogènesi hi haurà una compactació final de la cromatina que farà impossible l'expressió dels productes gènics necessaris per a la viabilitat de les cèl·lules. Això fa que el citoplasma hagi de contenir productes subministrats per les cèl·lules de Sertoli o productes gènics fabricats abans de la meïosi, potser en forma de mRNA altament estable, per tal de

mantenir viables totes les gàmetes haploides durant la diferenciació (5). A més, el fet de ser haploides significa que algunes gàmetes masculines seran portadores del cromosoma X matern, mentre d'altres portaran el cromosoma Y patern. El cromosoma X conté molts gens essencials que falten al cromosoma Y, fet que incrementa la dependència del seu citoplasma fins i tot per a la seva viabilitat en les etapes posteriors, com a cèl.lules úniques i independents fins a la fecundació de l'òvul (5).

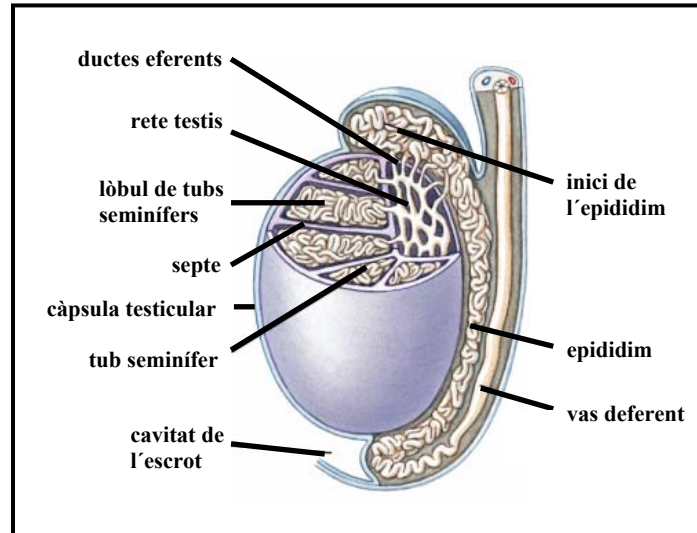
Entre el teixit connectiu que separa els tubs seminífers el principal tipus cel.lular són les cèl.lules de Leydig (**Ly**). Aquestes són les cèl.lules intersticials del testicle responsables de la secreció d'hormones masculines i estan distribuïdes aïlladament, o en forma de grups, en associació amb els capil.lars sanguinis i limfàtics. Són cèl.lules grans amb un citoplasma eosinòfil que pot contenir un nombre variable de vacuoles lipídiques (406). La testosterona, la principal hormona secretada per les cèl.lules de Leydig, és responsable dels trets sexuals masculins i del constant funcionament de l'epiteli seminífer. A la vegada, l'activitat secretora de les cèl.lules de Leydig és controlada per la hormona luteinizant (LH), secretada per la glàndula pituïtària durant la pubertat. La LH estimula les cèl.lules de Leydig a secretar testosterona i aquesta, estimula l'espermatoïgenesis probablement a través de la seva acció sobre les cèl.lules de Sertoli.



Esquema 6. Distribució de les sèries espermàtiques i altres tipus cel.lulars en un tall transversal d'un tub seminífer

Dins el testicle hi ha uns 250 lòbuls i dins de cada lòbul hi ha els tubs seminífers replegats, on té lloc l'espermatoïgenesis i l'espermioïgenesis. Aquests processos tarden nou setmanes en humans i es donen en onades sincronitzades al llarg dels tubs seminífers, de manera que en un tall histològic es poden identificar totes les fases de la maduració (**Esquema 7**). Els espermatoïdes madurs abandonen els tubs seminífers a través de la llum desenvocant a la rete testis, un seguit d'espais plexiformes format per teixit connectiu i una capa de cèl.lules epitelials cuboidals que poden ser flagel.lades. Aquests flagels ajuden a la circulació cap als ductes eferents i l'epidídim, on finalitzarà la maduració de l'espermatoïde fins esdevenir mòbil. La rete testis connecta amb l'epidídim a través dels ductes eferents, una dotzena de conductes buits formats per una capa de cèl.lules epitelials, algunes de les quals són ciliades i amb un pigment marronós de composició desconeguda, i capes circulars de cèl.lules musculars. L'epidídim és un conducte llarg i replegat on s'acumulen i emmagatzemen els espermatoïdes a la part

central de la llum, i on a la vegada desenvolupen la seva motilitat. Des de la part proximal fins a la part distal de l'epidídim es passa d'una a tres capes circulars de cèl.lules musculars. El sistema nerviós simpàtic estimula aquesta musculatura facilitant un moviment rítmic que permet el transport dels espermatozoides cap al vas deferent. Aquest conducte comunica l'epidídim amb la uretra i igual que l'epidídim també està envoltat de cèl.lules musculars estimulades pel sistema nerviós simpàtic, permetent fortes constriccions per expel.lir el seu contingut durant l'ejaculació (406).



Esquema 7. Organització del testicle

1.4 p53 i apoptosi en testicles

L'apoptosi en les cèl.lules immadures de testicle ha estat descrita com a un mecanisme fisiològic útil per eliminar les cèl.lules aberrants que poden provenir de la difícil coordinació entre la mitosi i l'inici de la meiosi, i per regular la densitat cel.lular (28).

En testicles de ratolins adults, p53 i el seu mRNA només són detectables a nivells baixos en els espermatòcits primaris en paquitè (8,327,344). Ni les espermatogònies, ni les cèl.lules de Leydig, ni de Sertoli mostren la seva presència (27).

Després de la irradiació els nivells de p53 es mantenen en els espermatòcits en paquitè, però tots els espermatòcits precursors, les espermatogònies diferenciades precursors (SB) i les cèl.lules de Sertoli mostren uns nivells elevats de p53 (de 1h a les 24h postirradiació). Per contra, les cèl.lules posteriors com les espermàtides són negatives (27,344).

Als 10 dies després de la irradiació s'observa una disminució de les espermatogònies i una greu devallada en el número d'espermatòcits derivats, indicant que moltes espermatogònies han mort com a conseqüència de l'apoptosi induïda per la irradiació (27). Les cèl.lules de Sertoli mostren ser radioresistents i la seva inducció de p53 després de la irradiació s'atribueix a una inducció dels mecanismes de reparació del DNA (27).

En els ratolins KO per p53 irradiats hi ha el fenomen contrari, ja que s'observa un increment en el número d'espermatòcits en paquitè als 10 dies postirradiació respecte els animals WT (27). Aquest increment indica una sincronització i una major

supervivència de les espermatogònies diferenciades capaces de dividir-se i diferenciar-se almenys fins a paquitè. Passat aquest estadi els espermatòcits també degeneren per processos independents de p53 (27).

Al mateix temps que hi ha una menor radiosensibilitat de les espermatogònies diferenciades (SB) deficientes en p53, també s'observa un increment de fins a set vegades en l'apoptosi de les espermatogònies indiferenciades (SA). Aquestes cèl.lules presenten un tamany gegant, poden sintetitzar DNA, però no es poden dividir i finalment entren en apoptosi entre els 8-15 dies postirradiació (379,380). En ocasions, alguna d'aquestes figures gegantines es pot observar en condicions normals en els tubs seminífers dels ratolins KO per p53, mentre que són indetectables en ratolins WT (27). Aquestes dades suggereixen que l'apoptosi d'espermatogònies independent de p53 no es restringeix a les espermatogònies diferenciades (152), sinó també a les no diferenciades o cèl.lules mare, ja sigui en condicions d'irradiació o en condicions normals (27).

En conjunt, aquests resultats mostren una funció indispensable de p53 en la producció d'espermatogònies i en la seva resposta a la radiació, ja que després de la radiació la major part de les espermatogònies expressen p53 a nivells elevats i pateixen apoptosi entre les 9-18h postirradiació (27). En aquestes cèl.lules p53 pot estar induïnt apoptosi possiblement a través de l'expressió de Bax, ja que els animals deficientes per Bax mostren una acumulació d'espermatogònies causada per la manca d'apoptosi en condicions normals.

Curiosament, en absència de p53 també s'observa una inducció d'apoptosi en les espermatogònies diferenciades, i sobretot indiferenciades, després del tractament amb radiació gamma (27). Malgrat que aquests processos independents de p53 són més lents i provoquen la mort de la cèl.lula en estadis molt posteriors a la radiació, semblen ser igualment efectius, ja que no s'observen espermatòcits més enllà de paquitè (27).

2 Resultats

2.1 Localització de la Ciclina O en testicle

El testicle és el teixit on fins ara s'han detectat els nivells d'expressió de l'mRNA de la Ciclina O més elevats en condicions normals (veure **Capítol 3, apartat 2A 2.2**). A la vegada, aquest teixit és l'únic de l'individu masculí on és dona la divisió cel·lular per meïosi, i es caracteritza per un patró d'expressió de proteïnes molt particular que rarament es troben en altres teixits, com la Ciclina A1 (216).

Fins al moment les hipòtesis de la funcionalitat de la Ciclina O apunten cap a una funció relacionada en l'apoptosi, probablement proapoptòtica, però no podem descartar altres funcions mediades per l'activació de kinases localitzades només en teixits que mostren un alt grau d'especialització com és el testicle.

Utilitzant l'anticòs policlonal C5 generat en conill, la proteïna Ciclina O en mostres de testicle de ratolí adult (4 mesos) presenta una localització variada que es pot concretar en dues zones: interior i exterior dels tubs seminífers (**Figura 1A i C**) i a la paret epitelial dels ductes eferent (**Figura 1B i D**).

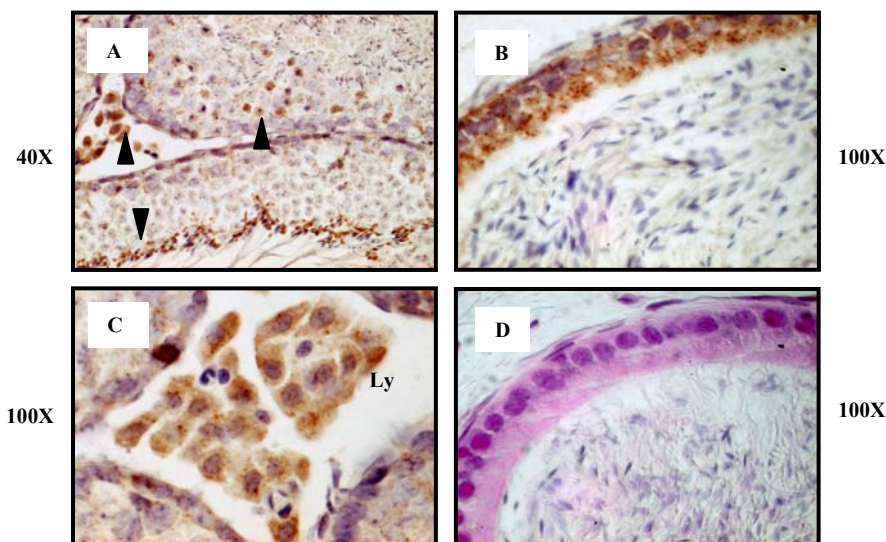


Figura 1. Expressió de la Ciclina O en testicle. Detecció de la proteïna Ciclina O per immunohistoquímica a l'interior i a l'interstici dels tubs seminífers (A), i al citoplasma de l'epiteli dels ductes eferents (B). Magnificació 100X de l'interstici dels tubs seminífers, mostrant les cèl.lules de Leydig (Ly) marcades positivament (C), i tinció amb H&E d'un ducte eferent (D). La mostra (A) ha estat irradiada amb 10Gy per tal d'incrementar el nombre de cèl.lules progenitores positives pel marcatge amb la Ciclina O.

2.2 Expressió de la Ciclina O en cèl.lules progenitores dels gàmetes masculins

A l'interior dels tubs seminífers, la Ciclina O es detecta al citoplasma de dos tipus cel·lulars diferents. Un d'aquests tipus cel·lulars correspon a cèl.lules progenitores dels espermatozoides rarament observades i més o menys properes a la paret del tub seminífer. L'observació d'aquestes cèl.lules mostra un citoplasma ovoide d'un tamany mig o petit i la presència de cromatina condensada similar a l'estadi de metafase (**Figura 1A i Figura 2A i B**). Cal remarcar que aquest tipus cel·lular no s'ha observat en cap de les nostres preparacions en condicions normals, però pot ser detectat en mostres irradiades 1, 3 i 6 dies després de la irradiació (10Gy).

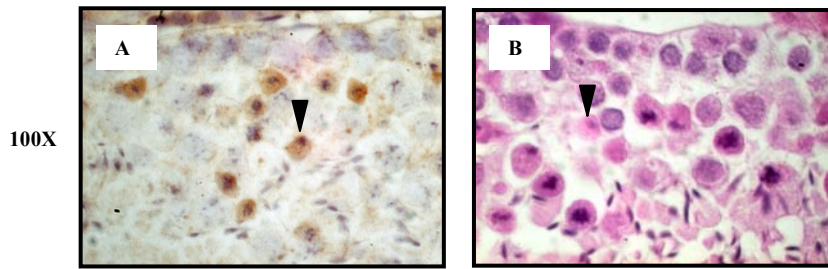


Figura 2. Expressió de la Ciclina O en cèl.lules progenitores de les gàmetes masculines. Detecció de la proteïna Ciclina O per immunohistoquímica al citoplasma de cèl.lules progenitores de l'espermatozoide (A). Representació de diferents estadis de en la progressió de l'espermatogènesi i l'espermiogènesi en una tinció amb H&E (B). Les mostres (A) i (B) han estat irradiades 10Gy, per enriquir el nombre de cèl.lules progenitores positives pel marcatge amb la Ciclina O. La part superior de les imatges es correspon amb la perifèria, mentre que la part inferior de les imatges s'apropen a la llum del tub seminífer.

2.3 Expressió de la Ciclina O en els cossos residuals

El segon tipus cel.lular positiu per la detecció de la Ciclina O són els espermatozoides en un estadi molt avançat de la seva maduració, però sempre en contacte amb la llum del tub seminífer. El citoplasma d'aquestes cèl.lules mostra dos tipus de tincions, una tinció difusa i en formes allargades, corresponent a les etapes finals d'espermiogènesi on el cap de l'espermatozoide es compacta en una forma plana i allargada (Figura 3A, B i C), o bé una tinció molt ben delimitada i arrodonida corresponent al citoplasma abandonat per l'espermatozoide madur un cop aquest ja ha estat alliberat a la llum del tub. Aquest citoplasma abandonat rep el nom de cos residual i serà fagocitat pel citoplasma de les cèl.lules de Sertoli (Figura 3D, E i F).

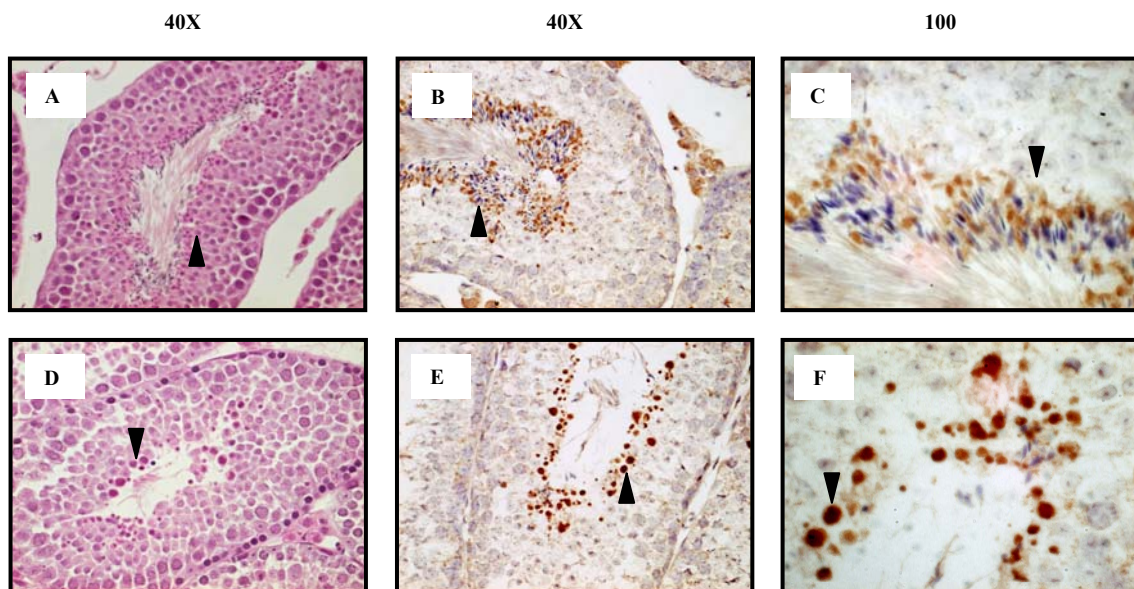


Figura 3. Expressió de la Ciclina O en etapes finals de l'espermiogènesi. Detecció de la proteïna Ciclina O per immunohistoquímica al citoplasma de l'espermatozoide madur (B), i als cossos residuals romanents quan s'han alliberat els espermatozoides (E). Tinció amb H&E (A i D) i magnificació 100X (C) i F dels estadis mencionats en B) i en (E) respectivament .

2.4 Expressió de la Ciclina O en els vasos eferents i en les cèl.lules de Leydig

Una vegada l'espermatozoide ha finalitzat l'espermiogènesi els seu citoplasma ha quedat molt reduït i no es detecta la presència de la Ciclina O (**Figura 1B**), tot i que hi ha cert fons o marcatge molt dèbil a la proporció de citoplasma que roman dins l'estructura del flagel. Aquests espermatozoides són alliberats a la llum dels tubs seminífers i seguiran una migració a través de diferents conductes on finalitzarà la seva maduració abans d'arribar a la uretra. Uns d'aquests conductes són els ductes eferents, encarregats de transportar els espermatozoides immòbils des dels tubs seminífers fins a l'epidídim, on s'emmagatzemen i adquireixen la corresponent motilitat flagel.lar. La monocapa de cèl.lules epitelials que revesteixen aquest conducte presenten nuclis arrodonits i citoplasmes columnars, alguns dels quals emeten cilis cap a la llum del conducte per facilitar el transport dels espermatozoides cap a l'epidídim. Clarament, la detecció de la Ciclina O als citoplasmes d'aquestes cèl.lules mostra una distribució granular predominant a la part apical en direcció a la llum dels ductes eferents (**Figura 1B i D**).

A l'exterior dels tubs seminífers hi ha una àmplia tinció generalitzada en tot el testicle que es deu a la presència abundant de la Ciclina O al citoplasma de les cèl.lules de Leydig (**Figura 1C**), el principal tipus cel.lular de l'interstíci entre els tubs seminífers.

3 Discussió

Com s'ha mostrat anteriorment (veure **Capítol 3, apartat 2A 2.2**) el testicle és el teixit examinat que presenta una major quantitat de mRNA de la Ciclina O.

La major part de l'expressió en els testicles es deu probablement a la gran quantitat de cèl.lules de Leydig, totes amb un elevat contingut de Ciclina O en el seu citoplasma, així com al citoplasma de les cèl.lules epitelials dels ductes eferents.

Els nivells de Ciclina O observats a les etapes finals de l'espermioogènesi representen una quantitat també important abans de la seva migració per la llum dels tubs seminífers. Finalment, l'expressió quantitativament menor es deu a un grup reduït de cèl.lules poc diferenciades pròximes a les parets interiors dels tubs seminífers que s'han detectat només en condicions d'irradiació.

Les cèl.lules de Leydig presenten uns nivells constantment elevats de la Ciclina O que no es veuen modificats per la radiació. L'expressió de la Ciclina O en aquestes cèl.lules, igual que al cervell (veure **Capítol 8, apartat 2.1**), no sembla estar vinculada a processos apoptòtics i s'observa també en ratolins deficients per p53 (resultat no mostrat). Així, l'expressió de la Ciclina O a les cèl.lules de Leydig no està regulada per p53, però una pregunta interessant a respondre és si aquesta expressió depèn d'altres membres de la família de p53, com p73 (109), de la maduració sexual de l'individu i de la presència de l'hormona luteinizant (LH) i/o de la secreció de testosterona. La testosterona de les cèl.lules de Leydig estimula l'espermatogènesi dels tubs seminífers, i de manera similar la Ciclina O podria exercir una funció reguladora sobre un o més tipus cel.lulars dins el tub seminífer.

En condicions normals, dins el tub seminífer no es detecta l'expressió de la Ciclina O en cap de les sèries espermàtiques. En canvi, després de la irradiació s'observa l'aparició de cèl.lules positives per la Ciclina O citoplasmàtica amb la cromatina condensada. Aquestes cèl.lules positives són poc abundants i relativament properes a la paret del tub seminífer, indicant que podrien ser espermatòcits primaris poc diferenciats (S1), o estadis lleugerament posteriors (S2 o S3).

Tal com s'ha descrit, l'expressió de p53 en condicions normals és només als espermatòcits S1 en paquità, però després de la irradiació p53 també s'indueix a les espermatogònies diferenciades precursoras (SB) causant la mort d'aquestes a les poques hores (27) i com a conseqüència, impeding la regeneració dels espermatòcits en estadis posteriors. A la vegada, la irradiació també activa mecanismes apoptòtics independents de p53 que causen una mort més tardana. Aquests processos independents de p53 provoquen un increment transitori d'espermatòcits paquitàtics danyats, provinents de les espermatogònies radiosensibles irradiades (27), que finalment també patiran l'apoptosi al cap d'uns 10 dies postirradiació.

L'expressió de la Ciclina O en condicions normals en cèl.lules de Leydig de testicles de ratolins KO per p53 (resultat no mostrat) fan pensar que la seva regulació és independent de p53 en aquest teixit. Aquest fet coincideix amb la lenta aparició de cèl.lules positives per la Ciclina O en algun estadi poc evolucionat del llinatge espermatogènic de ratolins WT després del tractament per irradiació. Aquest marcatge sembla ser degut a una resposta lenta al tractament per irradiació, ja que aquestes

cèl.lules positives per la Ciclina O s'aprecien a 1, 3 i 6 dies postirradiació, però no en condicions normals.

En conjunt, aquestes dades suggereixen que l'apoptosi independent de p53 pot estar regulada per la inducció de la Ciclina O a través de mecanismes sensibles al dany genòmic. Així, l'activació d'aquests mecanismes després de la radiació permetrien la divisió i diferenciació de les espermatogònies radiosensibles provocant l'aparició i acumulació posterior de cèl.lules positives per la Ciclina O que finalment moriran en l'estadi de paquitè tal com ha estat descrit anteriorment (27).

Caldrà doncs determinar en quin estadi de la meiosi es troben aquestes cèl.lules positives per la Ciclina O i si finalment aquestes moren per apoptosi per tal d'afirmar que la Ciclina O pot estar regulant un *checkpoint* apoptòtic independent de p53.

Curiosament, l'expressió de la Ciclina O en els processos apoptòtics dels enteròcits i queratinòcits (veure **Capítol 5, apartat 2.2 i Capítol 9, apartat 3.4**) també es manté en ratolins deficients per p53 (resultat no mostrat). Podria ser que la seva regulació vingués per proteïnes com p73 (109), suggerint que aquest *checkpoint* d'apoptosi és un mecanisme general i actiu en molts teixits, especialment en desenvolupament, on p53 no sembla tenir una funció predominant (veure **Capítol 9, apartat 3.7**).

Cal remarcar que a part dels ductes eferents no s'han estudiat altres ductes com la rete testis, l'epidídim o el vas deferent. La presència de la Ciclina O en cèl.lules epitelials d'altres òrgans com l'intestí, el pulmó, l'epidermis i l'aorta dorsal (veure **Capítols 5 i 6, apartat 2.1, i Capítol 9, apartat 3.6**) fan pensar en una expressió generalitzada de la Ciclina O en diferents epitelis de l'organisme, en alguns casos amb una clara correlació amb l'apoptosi.

Fins al moment desconeixem el mecanisme funcional de la Ciclina O, tot i que la hipòtesi principal és que aquesta proteïna actua a través de l'activació de la kinasa Cdk2 (veure **Capítol 2, apartat 2.1**). Els ratolins deficients per aquesta kinasa són viables, indicant que la pèrdua de Cdk2 pot ser corregida per altres proteïnes cdk. Tanmateix, els ratolins KO per Cdk2 no són fèrtils, suggerint que aquesta és una funció pròpia de Cdk2 que no pot ser adoptada per cap altra kinasa (26,286). Els defectes d'aquests ratolins són visibles al dia P20, quan les cèl.lules germinals han completat la meiosi I per formar espermatòcits secundaris diploides. En aquest estadi s'observa una apoptosi massiva d'espermatòcits paquitènics i no es detecten espermàtides terciàries (S3) ni les etapes posteriors, indicant que no s'ha progressat a través de la meiosi II (26,286). Aquest fenotip és molt similar a l'apoptosi independent de p53 (27) i a la vegada resultaria interessant determinar si en absència de Cdk2 l'apoptosi massiva observada coincideix amb un increment de la Ciclina O. Aquest fet descartaria l'exclusivitat de la Ciclina O amb Cdk2, suggerint la funcionalitat també a través de la unió amb altres kinases, com per exemple Cdk1.

Tal com s'havia descrit en els animals salvatges, Cdk2 es pot localitzar a les regions telomèriques dels cromosomes condensats i sembla formar part de la placa d'unio en la profase meiòtica (18,286). La Ciclina O es detecta abundantment al citoplasma dels espermatòcits irradiats, encara que no es pot descartar una presència inicial més modesta i localitzada com en el cas dels condroblasts (veure **Capítol 9, apartat 3.2**). Així doncs, seria interessant estudiar la presència i distribució de la Ciclina O i Cdk2 en els estadis de maduració sexual de ratolins, on hi ha una sincronització natural dels processos de l'espermatogènesi. Concretament a P20, quan es dona la profase I i la funció de Cdk2 és rellevant.

La Ciclina O és abundant al citoplasma d'espermàtides poc madures, i posteriorment, als cossos residuals que seran fagocitats per les cèl.lules de Sertoli. Aquesta expressió és independent de p53, ja que també es dona en ratolins p53 KO (resultat no mostrat).

Amb molta probabilitat, la Ciclina O present als cossos residuals no ha estat sintetitzada pel genoma haploide de l'espermàtide S3 degut al seu alt grau de compactació. Això indica que hi podria haver un pool de mRNA latent en les espermàtides S3 provinent de les cèl.lules de Sertoli o de la transcripció d'mRNA que es dona a la profase I (diplotè) abans d'iniciar la meïosi II. Alternativament, el citoplasma de les cèl.lules de Sertoli està en contacte amb els sincicis de les sèries espermàtiques, de manera que es podria transmetre l'mRNA de la Ciclina O a partir d'aquestes cèl.lules "mainadera" i a través d'aquests ponts citoplasmàtics.

Les cèl.lules de Sertoli no produeixen Ciclina O ni després de ser irradiades, fet que podria facilitar la seva radioresistència. En canvi, la irradiació indueix la mort per apoptosi independent de p53 en els espermatòcits primàris postpaquitènics (27), coincidint amb un increment de l'expressió de la Ciclina O observat en aquest estadi. Així, en condicions normals els espermatòcits en diplotè podrien mantenir l'mRNA de la Ciclina O no traduït a través de mecanismes postranscripcionals (veure **Capítol 3, apartat 1B**), mentre que en condicions de dany genòmic aquest transcrit seria traduït induïnt l'apoptosi. Si aquestes condicions no es donen l'mRNA de la Ciclina O és traduït sense ser perjudicials per la cèl.lula, ja que sembla intervenir en l'eliminació del citoplasma residual quan l'espermatozoide madur ja ha estat alliberat a la llum del tub seminífer. Aquest mecanisme té molta similitud a la mort cel.lular programada, però en aquest cas la degeneració és parcial i dedicada exclusivament al citoplasma.

Finalment cal remarcar que les cèl.lules del testicle expressen variants anòmales de la maquinària que habitualment controla la mitosi de les cèl.lules somàtiques.

Hi ha dos gens que produeixen la Ciclina A, el gen *ciclina A1* i el gen *ciclina A2*. La Ciclina A1 és una proteïna que s'expressa exclusivament en les línies germinals masculines i femenines, i a la vegada és capaç d'activar la kinasa Cdk2 (28). Els ratolins deficients per la Ciclina A1 mostren que aquesta proteïna és essencial en la línia germinal masculina, però no en la femenina (216). Per contra, la Ciclina A2 s'expressa de manera ubiqüa, per tant també en testicle, i sembla ser la principal responsable de l'activació de Cdk2 i Cdk1 en la mitosi de les cèl.lules somàtiques (265). Els animals deficients per la Ciclina A2 són letals a les primeres etapes embrionàries (265).

Els patrons d'expressió de Cdk1 i Cdk2 són molt similars durant l'espermatogènesi, però mentre Cdk2 es pot detectar unida a la cromatina meiótica, Cdk1 sembla ser incapaç (311). En testicle s'expressen dues variants de *splicing* de Cdk2 igualment actives, la detectada freqüentment en cèl.lules somàtiques, de 33kDa, i una variant de 39kDa (193,278). La Ciclina A2 és incapaç d'unir-se a Cdk1 en testicle i mostra preferència per la variant habitual de 33kDa de Cdk2, especialment en l'inici de la profase I (paquitè) (311), mentre que la Ciclina A1 pot formar complexos actius amb Cdk1 i s'uneix també a Cdk2, preferentment a la variant de 39kDa (362).

A més, els gens de la Ciclina B, *ciclina B1* i *ciclina B2*, també s'expressen en les cèl.lules meiótiques del testicle. Aquesta ciclina no forma complexos actius amb la variant de 33kDa de Cdk2 en cèl.lules somàtiques, però no es coneix la seva possible funció amb la variant de 39kDa (298).

Aquestes dades mostren una complicada xarxa d'interaccions i funcions d'aquestes proteïnes en etapes molt concretes de la meïosi, fent previsible una o varies funcions específiques de la Ciclina O activant complexos amb Cdk1, o amb alguna de les variants de Cdk2.

Capítol 8. Expressió de la Ciclina O al sistema nerviós central

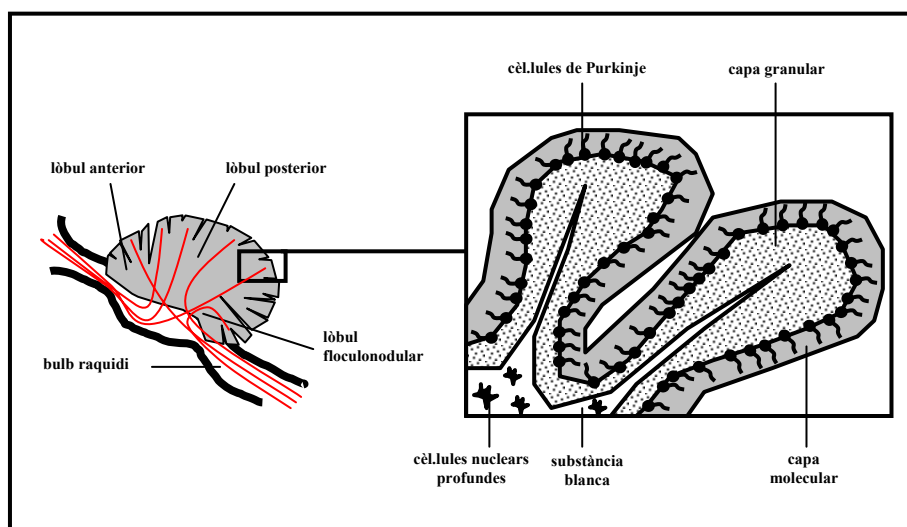
1 Introducció

1.1 Funcionalitat del cerebel i les cèl·lules de Purkinje

Igual que el timus, la melsa i l'intestí prim, el sistema nerviós en desenvolupament pateix apoptosi i l'activació de p53 després de la irradiació. A la vegada, els ratolins deficients per p53 són resistents a l'apoptosi en aquests teixits després del tractament amb radiació gamma, indicant que p53 és necessari per la seva radiosensibilitat (108).

En començar un moviment intencionat el cerebel permet la coordinació fina proporcionant senyals ràpides d'encesa i apagada de manera simultània als músculs agonistes i antagonistes, respectivament. Quan el moviment s'acaba, el cerebel és responsable d'apagar la musculatura agonista i encendre l'antagonista.

El còrtex cerebel·lar compren dues zones: una capa externa fortament eosinòfila amb molt neuròpil i pocs nuclis, anomenada capa molecular (**M**), i una capa interna anomenada granular (**G**) amb molts nuclis. Les cèl·lules de Purkinje són neurones multipolars que formen una monocapa entre les capes molecular i granular. La zona central del cerebel està formada per fibres nervioses densament empaquetades i mielinitzades formant la substància blanca (**B**) (**Esquema 1**). En ella es troben els nuclis olivaris superiors i nuclis dentats superiors del cerebel (406).



Esquema 1. Estructura del còrtex cerebel·lar i posicionament de les cèl·lules de Purkinje

Les cèl·lules de Purkinje tenen un gran cos neuronal i dendrites relativament llargues i ramificades en direcció a la capa molecular que permeten la connexió amb moltes altres neurones del còrtex cerebel·lar. A la vegada, les cèl·lules de Purkinje són la unitat funcional del cerebel, disparen de 50 a 100 potencials d'acció per segon en repòs, i es poden modular a l'alça i a la baixa segons les connexions amb diferents tipus cel·lulars neuronals. Aquest tipus cel·lular particular rep senyals excitadores o inhibidores principalment de tres orígens: les cèl·lules nuclears profundes, les fibres trepadores i les fibres musgoses. Les cèl·lules nuclears profundes, situades a la substància blanca del

cerebel, reben senyals excitadores de connexions amb fibres aferents que provenen directament de la perifèria o del cervell i inhibeixen l'excitació de les cèl.lules de Purkinje. Les fibres trepadores, provinents del bulb raquidi, arriben fins a la capa molecular del còrtex i són capaces de formar unes 300 sinapsis al soma i a les dendrites d'una sola cèl.lula de Purkinje. Les fibres musgoses, provinents de múltiples zones, envien senyals col.laterals a les cèl.lules nuclears profundes (substància blànca), a la vegada que arriben directament fins a la capa granular on faran sinapsis amb centenars de neurones granulars. Aquestes envien axons verticals cap a la capa molecular, i un cop aquí es ramifiquen en dos i s'orienten horitzontalment formant les fibres nervioses paral.leles. De 80.000 a 200.000 fibres paral.leles de la capa granular formen sinapsis amb cada cèl.lula de Purkinje, ja que cal tenir en compte que hi ha entre 500-1.000 cèl.lules de la capa granular per 1 sola cèl.lula de Purkinje, i cada fibra estableix contacte amb unes 250-500 cèl.lules de Purkinje durant el seu curs. Aquestes connexions indirectes entre les fibres de musgoses i les cèl.lules de Purkinje són dèbils, de manera que per activar les cèl.lules de Purkinje calen moltes fibres musgoses excitades.

A la capa molecular del cerebel també hi ha cèl.lules més o menys veïnes a les cèl.lules de Purkinje (astròcits, *basquet cells* i cèl.lules de Golgi) que afecten el seu potencial d'acció de manera indirecta. Els astròcits i les *basquet cells* tenen prolongacions curtes perpendiculars a les fibres paral.leles que emeten senyals inhibidores a les cèl.lules de Purkinje. Les cèl.lules de Golgi estan situades just sota les fibres paral.leles i emeten una senyal inhibidora a les cèl.lules de la capa granular per limitar l'excitació provinent d'aquestes cap a les cèl.lules de Purkinje a través d'un *feedback* negatiu (406).

1.2 Desenvolupament del cerebel

Les neurones granulars del cerebel són el tipus cel.lular més abundant del sistema nerviós central i representen la sortida exclusiva de la informació processada al còrtex cerebel.lar, enviant una gran quantitat de connexions a les cèl.lules de Purkinje (160). La proporció de neurones granulars i cèl.lules de Purkinje està estretament regulada, tot i que la estequiometria pot variar entre diferents espècies (206). La base molecular del desenvolupament coordinat d'aquestes dues poblacions és incerta, encara que és creu que es basa en processos apoptòtics de les neurones granulars (412).

La major part del desenvolupament del cerebel és postnatal. Al naixement, el cerebel està cobert per una capa de neurones granulars germinals i proliferants que seran les precursors de la capa granular externa (EGL). Aquestes cèl.lules proliferants migraran de la EGL, durant les 2 o 3 setmanes postnats, per formar la capa granular interna (IGL). Durant aquesta migració les cèl.lules s'aturen la proliferació atravessen la barrera monocapa de cèl.lules de Purkinje postmitòtiques, amb les quals faran sinapsis. Així, la IGL estarà formada per neurones granulars postmitòtiques provinents de la migració de les cèl.lules germinals proliferants de la EGL.

En les primeres setmanes postnats la IGL generada s'anirà transformant en la capa molecular (M) formada per axons, dendrites, astròcits i *basquet cells*. Les neurones granulars de la EGL, ara anomenada simplement capa granular (G), envien axons cap a la capa molecular fent sinapsis amb les cèl.lules de Purkinje en desenvolupament a la segona setmana postnatal (160).

Durant el desenvolupament de les capes granulars, concretament a les primeres dues setmanes de desenvolupament postnatal, s'ha observat un mecanisme fisiològic d'apoptosi que afecta a les neurones granulars *in vivo* (412). Aquesta apoptosi espontània, i independent de p53, es detecta només a les dues capes de neurones granulars (EGL i IGL) en ratolins que tenen de 5 fins a 11 dies d'edat, éssent el dia 7 el de major grau apoptòtic. A part d'aquesta apoptosi no induïda, les neurones granulars germinals i en proliferació de la EGL, (precursoras de la IGL formada per neurones granulars postmitòtiques), són altament sensibles a la radiació gamma fins al punt d'alterar el desenvolupament normal del cerebel en els ratolins adults postirradiats (11,157). Estudis amb microscopia electrònica han mostrat que aquestes neurones granulars sensibles a la radiació observades en EGL del cerebel, i també en hipocamp, mostren els trets característics d'una apoptosi dependent de la inducció de p53 i de la síntesi de proteïnes, ja que no es dona en ratolins deficients per p53 igualment irradiats (99,158).

Així, 5h després del tractament amb radiació gamma hi ha un increment de l'apoptosi de cèl.lules de la EGL significativa causant una pèrdua de densitat cel.lular d'aquesta capa (413). També hi ha cert grau d'apoptosi, encara que molt menor, a les cèl.lules postmitòtiques de la IGL després de la radiació. Encara que aquesta podria ser deguda a la recent migració de les cèl.lules provinents de la EGL irradiada (413).

1.3 Neurogènesi a l'hipocamp

La neurogènesi o la generació de noves neurones al sistema nerviós central està mediada per cèl.lules progenitores neurals (NPC) esparcides per tot el cervell (42,112,291). Malgrat aquesta àmplia distribució només en resposta a certes senyals i en àrees discretes, com l'hipocamp, la generació de noves neurones es manté durant tota la vida de l'individu (361).

En aquest cas, la neurogènesi va associada estretament a les funcions hipocampals d'aprenentatge i memòria (98,341). Així, les alteracions en el microambient d'aquestes cèl.lules progenitores pot provocar una neurogènesi ectòpica (227,271) o un bloqueig de la neurogènesi essencial, comportant dèficits de memòria i en l'aprenentatge com els observats en pacients que han rebut una teràpia d'irradiació cranial (252).

En models animals la irradiació cranial bloqueja la neurogènesi hipocampal, en part a causa del dany al microentorn, impeding la neurogènesi endògena. Aquest dany indueix l'expressió de citocines proimmflamatòries al sistema nerviós central i perifèric, i la secreció d'hormones d'estrès, com els glucocorticoides, responsables de la inhibició de la neurogènesi hipocampal (43). La inflamació extensiva de la microglia de l'hipocamp i l'alliberament de citocines proinflamàtores que acompanyen a la irradiació en aquestes cèl.lules poden influir sobre les cèl.lules progenitores (378). En aquest sentit, s'ha observat que la neuroinflamació que pot inhibir la neurogènesi a través de diferents mecanismes, incluint l'estimulació de l'eix hipotalàmic-pituitari-adrenal (HPA) amb una conseqüent elevació dels nivells dels glucocorticoides, alterant la relació entre les cèl.lules neuronals progenitores i les cèl.lules neurovasculars, o mitjançant efectes directes de la microglia activada i les cèl.lules precursoras (254). S'ha vist per exemple que la microglia activada a través de l'administració de lipopolisacàrid (LPS) intraperitoneal incrementa l'expressió de citocines proinflamàtores com la IL6 (254), descrita com un potent inhibidor de la neurogènesi de l'hipocamp en neuroinflamació (378).

2 Resultats

2.1 Expressió de la Ciclina O en cerebel, hipocamp i còrtex de ratolí.

Els nivells de l'mRNA de la Ciclina O en diferents teixits mostren una expressió molt baixa d'aquest gen, detectable només al sistema nerviós central (SNC), al pulmó i als testicles (veure **Capítol 3, apartat 2A 2.2**).

La detecció de la Ciclina O mitjançant experiments d'immunohistoquímica mostra la presència d'aquesta proteïna en grups reduïts de cèl.lules del cerebel i de l'hipocamp, i més generalitzada al còrtex cerebral de ratolins adults.

La detecció al cerebel inclou un marcatge prominent al cos neuronal de les cèl.lules de Purkinje i als cossos neuronals d'algunes cèl.lules dels nuclis profunds situats a l'interior de la substància blanca (resultat no mostrat). En menor grau s'observa un marcatge clar als cossos neuronals de les cèl.lules de la capa molecular, probablement astròcits, cèl.lules de Golgi i *basquet cells*. Al mateix temps, a la capa molecular s'observa un marcatge difús i fibrós que suggereix la presència de la Ciclina O a les extensions dendrítiques de les cèl.lules de Purkinje i de les cèl.lules de Golgi, entre d'altres (**Figura 1 A i B**).

A l'hipocamp la presència de la Ciclina O es centra bàsicament al cos de les neurones granulars del gir dentat, amb un increment significatiu a la part interior del gir i una tinció més feble a les cèl.lules més exteriors (**Figura 1 C i D**).

Al còrtex cerebral hi ha un marcatge de la Ciclina O molt generalitzat que afecta a la major part dels cossos neuronals que conformen la substància gris. A la substància blanca no s'observa la presència de Ciclina O (**Figura 1 E i F**).

2.2 Inducció de la Ciclina O dependent d'irradiació al sistema nerviós central de ratolí

La radiació té efectes genotòxics que indueixen l'apoptosi en el timus, la melsa, l'epiteli intestinal i algunes regions del sistema nerviós central de manera dependent de p53. La possible regulació de l'expressió de la Ciclina O per p53 (veure **Capítol 3, apartat 2A 2.1**) i la presència abundant d'aquesta ciclina al sistema nerviós central en condicions normals suggeriren l'estudi de la inducció d'aquesta proteïna en condicions d'irradiació *in vivo*. Inicialment, l'elevada quantitat de Ciclina O present al SNC fa imperceptibles els petits canvis després d'irradiació, ja que utilitzant la concentració habitual de l'anticòs no s'aprecià cap increment ni pèrdua en els nivells de proteïna. Per evitar aquest problema de saturació de l'anticòs s'ha optat per la seva dilució augmentant la sensibilitat de detecció dels canvis lleus dels nivells de proteïna. En aquestes condicions es subestimen els nivells totals de la Ciclina O que serien clarament observables en condicions normals, a les 0h i fins a les 6h postirradiació, però s'observa un increment generalitzat de la Ciclina O al cap d'1 dia i als 3 dies postirradiació.

L'increment de la Ciclina O després d'irradiació afecta a les zones del teixit descrites anteriorment, tant en les zones dels cossos neuronals com en les extensions cel.lulars del cerebel, l'hipocamp i el còrtex cerebral. On aquest increment és més evident es a les cèl.lules de Purkinje i a les neurones granulars del gir dentat de l'hipocamp (**Figura 2 A**).

Per determinar si els canvis en els nivells de la Ciclina O són atribuïbles a una estabilització de la proteïna, o alternativament es deuen a un increment en l'expressió del gen de la Ciclina O, s'han quantificat els nivells del seu mRNA després d'irradiació. Aquests nivells incrementen en un 20% a les 3h i en un 130% a les 6h postirradiació, suggerint que l'expressió gènica de la Ciclina O al SNC s'activa per mecanismes dependents de la radiació (**Figura 2 B**).

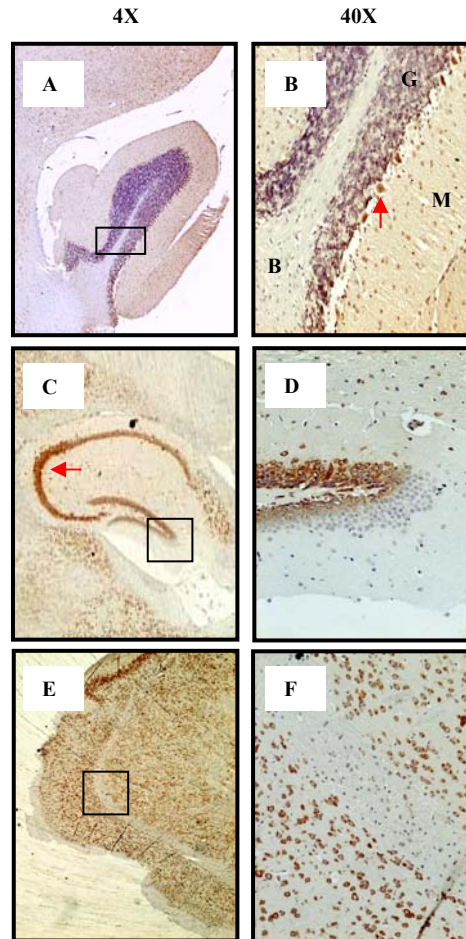


Figura 1. Patró d'expressió de la Ciclina O al sistema nerviós central de ratolí.

Detecció de la Ciclina O, per immunohistoquímica, a les cèl.lules de Purkinje del cerebel (A i B), a les neurones granulars del gir dentat de l'hipocamp, en concret a la zona interior del gir, indicat amb la fletxa vermella (C i D), i a les neurones corticals del cervell (E i F). (a B: la fletxa vermella indica el cos neuronal d'una cèl.lula de Purkinje, B; substància blanca, M; capa molecular, G; capa granular).

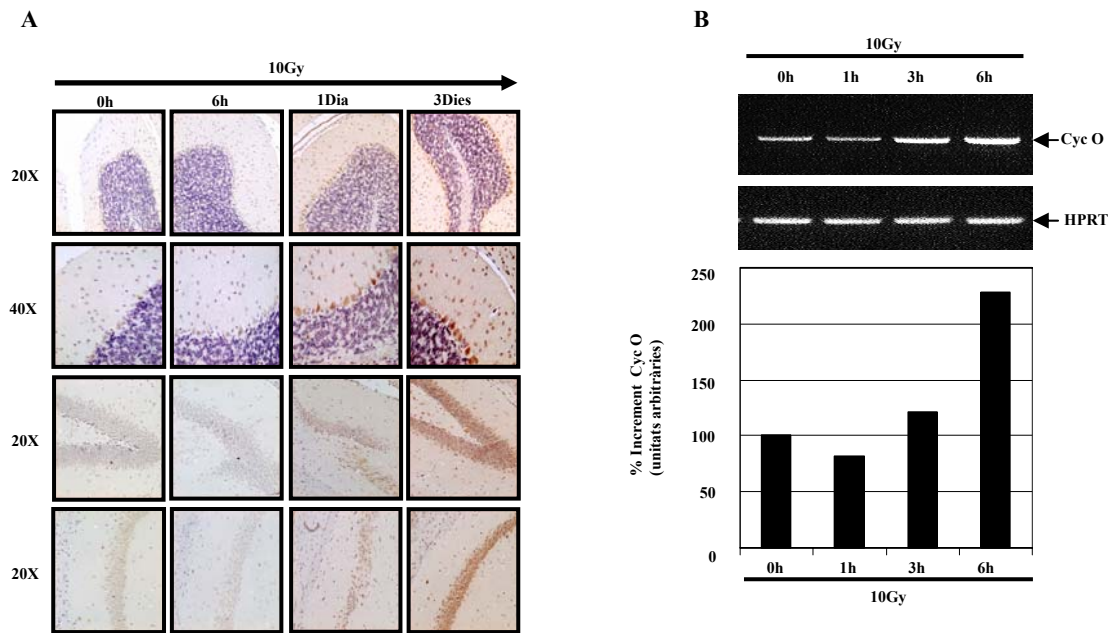


Figura 2. Inducció de la Cyclina O dependent d'irradiació al sistema nerviós central de ratolí. Detecció de la Cyclina O, per immunohistoquímica, a les cèl.lules de Purkinje del cerebel i a les neurones i fibres nervioses de la capa molecular (20X i 40X). Es mostra també dues porcions diferents de les neurones granulars del gir dentat de l'hipocamp després d'irradiació (20X) (A). Anàlisi semiquantitativa, per RT-PCR, dels nivells de mRNA de la Cyclina O al sistema nerviós central de ratolí després d'irradiació (B). (el 100% d'expressió de la Cyclina O fa referència a l'expressió basal a 0h).

3 Discussió

3.1 Apoptosi espontània i induïda al cerebel

L'apoptosi espontània del cerebel a les primeres setmanes d'edat es detecta a les dues capes granulars presents en ratolí, però és majoritària a la EGL i es localitza a la part més externa d'aquesta capa (412,413), on les cèl.lules es divideixen més ràpid (proliferating zone). A la zones més internes les cèl.lules tenen menys mitosi i migraran cap a la capa IGL postmitòtica (pre-migrating zone) (10,201).

Aquest tipus d'apoptosi és independent de p53 i acaba reduïnt el número de neurones granulars en els animals adults fins assolir l'estequiometria adient per la connexió efectiva entre les neurones granulars i les cèl.lules de Purkinje (413). A la vegada, s'ha observat que la radiació gamma pot eliminar la EGL a través de l'activació de p53 alterant la proporció entre neurones granulars i cèl.lules de Purkinje en el futur animal adult sense alterar les cèl.lules postmitòtiques de la IGL (413).

Aquests fenòmens cerebel·lars, tant la mort fisiològica independent de p53 com la induïda i dependent de p53, tenen certa similitud amb l'apoptosi descrita en les cèl.lules epitelials de les criptes de l'intestí prim (veure **Capítol 5, apartat 1.2**). En ambdós casos hi ha cèl.lules proliferants altament sensibles a la mort per irradiació dependent de p53 i a la mort espontània, mentre que durant la migració aquestes cèl.lules es diferencien, deixen de proliferar, i es transformen en cèl.lules radioresistents.

En el cas de les cèl.lules epitelials l'expressió de la Ciclina O durant els processos apoptòtics, (ja siguin espontanis o induïts per p53), s'ha detectat majoritàriament en les cèl.lules proliferants. Precisament aquestes són les més sensibles a l'apoptosi i per tant, seria interessant determinar si la correlació entre la mort cel·lular i l'expressió de la Ciclina O es reproduïx també en les capes EGL i IGL del cerebel en desenvolupament, tant en ratolins salvatges com en animals KO per p53.

En ratolins adults hem detectat elevats nivells de Ciclina O en les cèl.lules de Purkinje i aquests incrementen lleugerament després de la irradiació. Ni en condicions normals ni tres dies després de la irradiació hem observat que l'expressió de la Ciclina O comporti cap dany aparent en aquestes cèl.lules, ni en altres cèl.lules del cerebel (cèl.lules dels nuclis profunds, neurones granulars, astròcits, cèl.lules de Golgi, *basquet cells*), així com tampoc s'aprecia cap canvi en l'arquitectura del teixit.

Precisament en les cèl.lules de Purkinje de ratolins adults s'han descrit nivells elevats d'expressió de p53, mentre que a les neurones granulars de la capa IGL i a les neurones de la capa molecular es detecten uns nivells inferiors d'aquesta proteïna (413). Habitualment, els nivells elevats de p53 van associats a un bloqueig del cycle cel·lular i a l'increment de l'apoptosi, però aquest no sembla ser el cas de les cèl.lules de Purkinje, ja que com s'ha dit anteriorment en condicions normals aquestes cèl.lules no semblen patir cap tipus de dany cel·lular.

Tant en el ratolí adult, com en desenvolupament postnatal, les cèl.lules de Purkinje i les cèl.lules de la capa IGL són cèl.lules postmitòtiques radioresistents. De fa temps s'ha suggerit que p53 podria exercir altres funcions en la neurobiologia de les cèl.lules de Purkinje, com per exemple, incrementar la resistència a l'apoptosi de les cèl.lules veïnes (les neurones granulars i de la capa molecular) a través de sinapsis funcionals (413).

En el nostre cas, la forta tinció de les cèl.lules de la capa granular amb hematoxilina ens podria impedir la detecció de nivells baixos de la Ciclina O, mentre que les fibres i els nuclis de la capa molecular són clarament positives per la Ciclina O.

En conjunt, les nostres observacions correlacionen un possible efecte de protecció a l'apoptosi de p53 en les cèl·lules de Purkinje i altres cèl·lules postmitòtiques, com la major part de les neurones del còrtex cerebral i del cerebel. Contràriament, p53 té un efecte proapoptòtic després d'irradiar les cèl·lules proliferants de la capa EGL en el desenvolupament postnatal. Per tant, serà interessant d'estudiar si en aquests tipus cel·lulars les funcions pro i antiapoptòtiques depenen de p53 i de la conseqüent activació de la Ciclina O, o si per contra, la Ciclina O obeeix alhora a mecanismes dependents i independents de p53, com sembla ser el cas de l'intestí prim.

3.2 Apoptosi a l'hipocamp

La hipòtesi anterior es corrobora en les cèl·lules neurogèniques de l'hipocamp, ja que aquestes són cèl·lules proliferants on s'ha descrit una inducció de p53 i un posterior increment de la mortalitat cel·lular després d'irradiació. En aquestes condicions, també hi ha un augment dels nivells de la Ciclina O a la zona del gir dentat de l'hipocamp.

Els rosegadors són més radioresistents que els humans, i una dosi de 10Gy d'irradiació cranial en aquests animals s'aproxima al llindar que causa la desmielinització neuronal (41). Aquesta dosi causa una resposta inflamatòria caracteritzada per l'activació de la microglia en el gir dentat de l'hipocamp, i un bloqueig en la proliferació de les cèl·lules neurogèniques (252). La resposta inflamatòria és la primera causa de la pèrdua de senyalització neurogènica, indicant que la neurogènesi i la inflamació mostren una correlació negativa particularment estreta al gir dentat adult.

La inflamació *per se*, sense prèvia irradiació, s'ha vist que pot suprimir la neurogènesi a través de l'acumulació d'interleucines proinflamatòries, com IL6, que actuen com a potents antineurogènics en el dany cerebral.

Tant la Ciclina O, com IL6 i el seu receptor, estan presents en l'hipocamp postnatal sense mostrar un efecte letal aparent. Potser l'acumulació, o alguns canvis postraduccional d'aquests factors en cas de dany o inflamació serien capaços d'induir la mort de les cèl·lules neurogèniques. La inflamació crònica després del tractament d'irradiació contribueix a la disfunció de les cèl·lules neurals progenitores, comportant una pèrdua de memòria i de la capacitat d'aprenentatge (254). La neuroinflamació i la patologia de la microglia són símptomatologies que acompanyen malalties on la pèrdua de memòria és prominent, per exemple, en la malaltia d'Alzheimer (81).

3.3 ATM i apoptosi neural

La inducció de p53 en el SNC dels ratolins ATM KO després de la irradiació és inferior que en els animals WT (142). En concret hi ha una manca d'estabilització de p53 al còrtex cerebral, al bulb olfatori i a l'hipocamp, i s'observa una lleu inducció al cerebel en els ratolins ATM KO en comparació amb els ratolins salvatge (142). Aquesta manca d'inducció de p53 en diferents regions del SNC dels ratolins ATM KO després d'irradiació (15Gy) coincideix amb l'absència de mort cel·lular respecte els ratolins WT (142). Això passa, concretament, en el gir dentat de l'hipocamp, a la retina, al còrtex cerebral i a la capa EGL del cerebel en desenvolupament. Així doncs, aquestes regions del SNC són propenses a la mort per dany al DNA, prèvia l'activació consecutiva d'ATM i p53 (142).

Com es d'esperar, els ratolins deficientes per p53 també són resistents a la mort per irradiació en el SNC, reforçant la importància d'aquesta via (142).

Aquestes dades estableixen una funció per ATM durant l'apoptosi induïda per irradiació en poblacions cel·lulars concretes del SNC, precisament on es mostra una activació de p53 i la presència de Ciclina O. És possible que les neurones necessitin ATM com a component d'un *checkpoint* de supervivència, de manera que les cèl·lules neurals que pateixen un dany genòmic important puguin ser eliminades potser a través de la Ciclina O com a component *downstream* d'aquesta via.

En les cèl·lules KO per ATM les mutacions acumulades comporten dèficits més endavant en l'animal adult, específicament a les cèl·lules de Purkinje o neurones granulars, ja que el dany d'aquestes cèl·lules s'ha vist responsable de la neurodegeneració selectiva en AT (328).

Caldria determinar el patró d'expressió de la Ciclina O en el SNC de ratolins deficientes per ATM i ratolins deficientes p53 per determinar la participació de la Ciclina O en aquesta ruta, ja que experiments en línies cel·lulars (veure **Capítol 2, apartat 1.5 i Capítol 3, apartat 2A 2.1**) suggereixen aquesta implicació.

Tot i que els defectes en ATM causen neurodegeneració, el paper fisiològic d'aquesta proteïna al sistema nerviós encara és poc clar. Tanmateix s'ha observat que els nivells d'ATM són elevats en el sistema nerviós en desenvolupament, però és expressat a nivells baixos al SNC adult. Corresponent amb els nivells d'ATM, s'ha vist que els defectes neurològics en AT són evidents a les primeres etapes de la vida, suggerint que s'originen ja en el desenvolupament, quan ATM és més abundant i probablement exerceix en major grau la seva funció (53).

Generalment la inducció de p53 i la seva funció van estretament lligades, però depenen específicament del teixit o del tipus cel·lular, indicant que hi ha certa heterogeneïtat *downstream* de p53. Així, es podria pensar que l'increment de p53 va associat a un increment massiu en l'apoptosi, com succeeix per exemple en la melsa i el timus, però això no sempre és així, ja que en osteòcits de la mèdulla òssia hi ha un increment de p53 que no es correspon amb un increment de l'apoptosi. Aquest fet té profundes implicacions que s'han de tenir en compte a l'hora de definir la diferent sensibilitat als agents genotòxics de cada teixit i preveure les respostes terapèutiques esperades dels tractaments antitumorals. La Ciclina O podria ser un dels elements *downstream* de p53 capaç de dirigir la seva activitat cap a l'apoptosi en cas d'activació.

Capítol 9. Expressió de la Ciclina O en desenvolupament

1 Introducció

Actualment s'accepta l'apoptosi com un dels mecanismes que actuen per controlar el desenvolupament i la diferenciació de l'embrió (76). Com és sabut, la pèrdua de funció de p53 en el 50% dels càncers humans és un indicatiu de la importància d'aquest supressor tumoral en la inducció de l'apoptosi (25). Així doncs, basant-nos en aquesta importància podem classificar els processos apoptòtics segons si són dependents, o no, de la regulació per p53. Tanmateix, no podem descartar que es presentin alhora, en el mateix òrgan o teixit, processos apoptòtics dependents i independents de p53.

Com s'ha vist, els ratolins deficientes per p53 són viables tot i presentar una major incidència tumoral en edat adulta (85,162). Per tant, p53 no sembla essencial per al desenvolupament d'aquests animals, però un estudi més detallat mostra com entre un 8 i un 16% d'embrions de ratolí presenten defectes en el tub neural (17,318), suggerint que p53 sí que pot tenir algunes funcions en el desenvolupament, concretament en el SNC.

1.1 Activitat transcripcional de p53

1.1.1 Activitat transcripcional de p53 en desenvolupament

Per estudiar l'activitat transcripcional de p53 s'han generat animals transgènics amb el gen de la β -Galactosidasa sota el control d'un promotor regulable per p53 (191). Aquests estudis mostren com en els embrions d'entre 7 i 9 dies no es detecta l'activitat transcripcional de p53, mentre que als 11 dies d'edat aquesta activitat és detectable al cervell, sobretot a la superfície de la regió talàmica, al còrtex cerebral, al cerebel i a l'hipotàlam. Curiosament, els embrions d'11 dies d'edat també mostren activitat transcripcional de p53 a l'os, suggerint que hi ha una activació de p53 específica als osteoblasts.

Per contra en alguns teixits embrionaris com el fetge, el múscul, el pulmó i el cor l'activitat transcripcional de p53 és indetectable o nul·la, mentre que l'activació endògena de la β -galactosidasa a l'intestí, al testicle i al ronyó fa inviable la detecció de l'activitat transcripcional de p53 mitjançant aquest sistema (191).

Més endavant, quan l'animal ja és adult, l'activitat transcripcional de p53 queda reduïda a alguns tipus cel·lulars, de manera que és indetectable en la majoria dels òrgans, excepte a algunes cèl·lules de la melsa, el timus, el sistema nerviós central (191) i l'intestí (96).

1.1.2 Inducció de l'activitat transcripcional de p53 dependent d'irradiació en el desenvolupament

En els embrions de 8 i 9 dies (quan encara no es detecta l'activitat transcripcional de p53 en condicions basals) s'observa un increment de l'activitat de p53 en la majoria de cèl·lules i teixits després d'induir dany cel·lular mitjançant el tractament amb irradiació. L'activitat més elevada es mostra a la zona del tub neural i als arcs viscerals, al timus, a la melsa i a l'intestí, incrementant a les 3h postirradiació i arribant al màxim a les 6h, coincidint amb un fenomen d'apoptosi massiva (191). Després de la radiació l'activitat transcripcional de p53 també es detecta a la membrana decidual de l'úter, però a

diferència de les cèl.lules embrionàries, aquestes no semblen patir apoptosi i són capaces de mantenir l'activitat transcripcional almenys fins a les 24h.

En embrions més tardans, o ratolins nous, no s'observen diferències en l'activitat transcripcional de p53 abans o després d'irradiació, tot i manifestar un augment de l'apoptosi. Coincidint amb aquesta manca de la resposta de p53 a la radiació s'ha observat que els nivells de mRNA de p53 disminueixen a partir del dia 13 de gestació (125,191). Malgrat aquesta disminució que afecta a tot l'embrió, el timus i la melsa mantenen uns nivells elevats de l'mRNA de p53 i fan possible l'acumulació de p53 i un fort increment de l'apoptosi després de la irradiació fins i tot en ratolins adults.

Estudiant els animals adults de 6 a 8 setmanes d'edat 24h després de ser irradiats s'observa un increment en l'activitat transcripcional de p53 només al timus, la melsa, l'intestí, el cervell i els ossos, però no als altres teixits estudiats (fetge, pulmó, múscul esquelètic i cor). Si s'analitza la presència de la proteïna després d'irradiar es pot veure que p53 és present en el timus, la melsa i els ossos (teixits amb activitat p53), però els nivells d'aquesta proteïna són baixos o són nuls en teixits com el cor, el pulmó, el cervell, la pell, el fetge i els músculs (teixits que tenen poca o indetectable activitat p53) (191).

1.2 Apoptosi dependent i independent de p53

1.2.1 Apoptosi dependent de p53

L'apoptosi dependent de p53 es detecta ràpidament després de la seva inducció, tant *in vitro* com *in vivo* (176,222). Els embrions salvatges de ratolí pateixen apoptosi 24h després d'irradiació en qualsevol estadi de desenvolupament. Concretament, al dia 9 de gestació l'apoptosi es localitza a tot el cervell, mentre que als 15 dies la localització al cervell no és tant generalitzada i es detecta principalment al telencefal i a la medulla espinal (108). Als 15 dies de gestació també es localitza apoptosi a la major part d'òrgans (medulla espinal, pulmó, paret de l'estómac i fetge), però els nivells del transcrit de p53 ja són molt baixos (125,191).

1.2.2 Apoptosi independent de p53 en embrions de 15 dies

En presència de p53, el dany al DNA activa immediatament els mecanismes apoptòtics que depenen d'aquest factor de transcripció (96), mentre que en la seva absència s'ha vist que actuen mecanismes alternatius tardans que també acaben induint l'apoptosi cel.lular (108).

A més dels estudis en línies cel.lular, aquestes dues cinètiques s'han mostrat en models *in vivo*, per exemple en l'epiteli intestinal (243). Les cèl.lules intestinals entren en apoptosi poques hores després de la radiació, però aquesta inducció immediata de l'apoptosi no s'observa en animals deficientes per p53. Tanmateix, dies després del tractament amb elevades dosis d'irradiació hi ha una segona onada d'apoptosi en absència de p53. Així, l'existència d'altres mecanismes que podrien compensar i substituir les funcions de p53 podrien actuar per aconseguir un desenvolupament de l'embrió aparentment normal en l'absència d'aquest factor de transcripció.

De la mateixa manera, la irradiació d'embrions salvatges de 8 dies no provoca cap increment en l'apoptosi als 7 dies després del tractament. En canvi, en el mateix

experiment realitzat en embrions deficients per p53 es detecta un patró d'apoptosi molt marcat (108). L'apoptosi que presenten els embrions deficients en p53 està localitzada als ossos amb ossificació mitocondrial, amb patrons que semblen confinats al cartílag, a l'epiteli alveolar del pulmó, als espais interdigitals de la mà, a la paret de l'estómac incloent l'epiteli luminal, i a l'epidermis de la major part de l'embrió exceptuant la zona cranial i cervical. En el cas del fetge sembla haver-hi uns nivells d'apoptosi sostinguts molt similars en ambdós genotips, WT i KO, que no es veuen alterats per la radiació (108). Curiosament, les parets que recobreixen els ventricles cerebrals no semblen estar afectades per l'apoptosi després del tractament per irradiació en cap dels dos genotips. Així doncs, el patró d'apoptosi dels animals deficients per p53 es deu a mecanismes alternatius que s'activen després de la radiació, però no de manera immediata.

2 Resultats

2.1 Patró d'expressió de la Ciclina O durant el desenvolupament

Per estudiar la possible implicació de la Ciclina O en el desenvolupament embrionari s'ha estudiat la seva localització en embrions de ratolí a diferents dies de gestació. Els nivells de Ciclina O són detectables a partir del dia 10,5 i incrementen a mesura que avança la gestació, almenys fins al dia 15,5. Sorprenentment, la Ciclina O es localitza a la major part de teixits en funció del seu grau de desenvolupament:

El dia 10,5 els nivells de la Ciclina O als embrions són elevats al cor, als feixos de cèl.lules mesenquimals encefàliques i a l'epiteli del bronqui principal (resultats no mostrats).

El dia 11,5 la Ciclina O s'expressa moderadament a les cèl.lules dels somites que formaran les vèrtebres de l'espina dorsal per ossificació endocondrial del cartílag, a la notocorda (**Figura 1 E11,5 A i B**) i fortament al citoplasma de feixos cel.lulars mesenquimals dins la cavitat cranial, situats entre el sistema nerviós central i el cartílag hialí que formarà els òssos de la base del crani (**Figura 1 E11,5 C**). La presència de la Ciclina O també s'observa, encara que més dèbilment, a les cèl.lules de l'epiteli pigmentari i neural de la retina, i al citoplasma de les cèl.lules formadores del cristal.lí i de la còrnia (**Figura 1 E11,5 C i D i Esquema 3**).

L'expressió a l'epiteli pigmentari és citoplasmàtica i tan baixa com a l'ectoderm que formarà la còrnia, en canvi, l'expressió a l'epiteli neural és més elevada i ben localitzada. L'epiteli neural és un epiteli pseudoestratificat constituït per cèl.lules fusiformes amb un nucli aplanat i allargat disposat al centre de la cèl.lula. Als extrems de les cèl.lules és doncs on s'acumula el citoplasma i on es detecta la presència de la Ciclina O, observant-se preferentment als citoplasmes que estan en contacte amb la llum i a la base de l'epiteli, però no als citoplasmes de les cèl.lules internes. La presència de la Ciclina O al cristal.lí es localitza tan a la perifèria com a la llum de la seva vesícula embrionària, ocupant el citoplasma lliure de nuclis de les cèl.lules posteriors i de les cèl.lules anteriors, respectivament. La detecció de la Ciclina O a l'ull és permanent durant tot el desenvolupament, però va disminuint en intensitat a la retina i al cristal.li, mantenint-se finalment a l'epiteli formador de la còrnia.

El dia 12,5 la Ciclina O es detecta fortament al citoplasma de les cèl.lules internes del cor, o cardiomiòcits, però no a les cèl.lules de la seva paret immediata (**Figura 1 E12,5 A i B**). La Ciclina O també es fa més evident en els feixos mesenquimals de la part central i inferior del crani, (**Figura 1 E12,5 C i D**). La localització de la Ciclina O en aquests feixos és puntual en un extrem del nucli fusiforme en algunes cèl.lules, mentre que en d'altres s'ha extès de manera difusa pel citoplasma estriat.

El dia 13,5 els embrions presenten feixos cel.lulars molt densos al llarg de tota la zona dorsal amb elevats nivells de Ciclina O (**Figura 1 E13,5 A i B**). Aquest feixos estan formats per cèl.lules musculars i la Ciclina O es localitza al citoplasma d'aquestes cèl.lules fusiformes. Observant les imatges a gran augment s'observa que el marcatge de la Ciclina O no és totalment difús pel citoplasma, sinó que mostra un patró fibrós que té la mateixa direcció del feix.

La Ciclina O també és present al citoplasma de l'epiteli estomacal (**Figura 1 E13,5 C i D**). De manera molt similar al marcatge observat en el cristal·lí i a l'epiteli neuronal de la vesícula embrionària del cristal·lí, la distribució de la Ciclina O a l'epiteli estomacal també mostra una clara preferència pel citoplasma de les cèl·lules en contacte amb la llum i amb la base de l'epiteli, però no per les cèl·lules més internes.

Exactament la mateixa distribució es pot observar als epitelis bronquials (**Figura 1 E13,5 E i F**), encara que en aquest cas la Ciclina O sembla més abundant al citoplasma que està en contacte amb l'exterior.

En aquest mateix estadi també s'observa una lleugera tinció de la Ciclina O al citoplasma de les cèl·lules que formen les vesícules primordials dels pèls sensitius del bigotí de l'animal (**Figura 1 E13,5 G i H**), i un marcatge generalitzat i fort al citoplasma de totes les cèl·lules que formen les arrels dels ganglis dorsals, just al costat de l'espina dorsal de l'embrió (**Figura 1 E13,5 I i J**).

El dia 14,5 de gestació la Ciclina O es detecta a diferents monocapes cel·lulars que conformen la paret de la cavitat abdominal que més endavant formaran el diafragma (**Figura 1 E14,5 A i B**). Les cèl·lules positives per la Ciclina O estan estretament unides unes amb les altres i presenten vacuoles clarament visibles de tamany mitjà. En aquest cas, la Ciclina O és present a gran part del citoplasma.

La presència de la Ciclina O a l'ull en aquesta etapa queda reduïda a l'epiteli formador de la còrnea provinent de l'ectoderm (**Figura 1 E14,5 C i D**). En aquesta etapa es pot observar com la vesícula òptica ja està semi-recoberta per les parpelles (**Figura 1 E14,5 C**). Observant les zones més laterals de l'ull, les parpelles ja recobreixen totalment la vesícula òptica. L'epiteli de les parpelles s'origina a partir de l'epidermis externa que expressa la Ciclina O, i com es pot observar (**Figura 1 E14,5 E**) manté l'expressió d'aquesta proteïna en la seva nova localització, la cara més interna propera a la còrnia de l'ull. A la vegada, s'observen estructures similars a les vesícules primordials dels pèls sensitius (**Figura 1 E14,5 F**), amb un patró de la Ciclina O molt similar a l'observat a dia E13,5 (**Figura 1 E13,5 G i H**).

Al dia 14,5 de gestació el cartílag hialí que servirà de model per la major part dels òssos del cos l'embrió i de la base del crani, ha augmentat de tamany i és fàcilment visible (177). En ell es poden diferenciar la zona immadura, amb els condroblasts aplanats pel creixement aposicional, i la zona madura, on grups reduïts de condrocits provinents de poques divisions mitòtiques contenen gotes lipídiques citoplasmàtiques que serviran per mantenir la matriu fibrosa extracel·lular del cartílag (**Esquema 1**).

A la zona immadura del cartílag hialí la Ciclina O s'observa de manera puntual a un dels extrems de la cèl·lula (**Figura 1 E14,5 G**). Quan aquestes cèl·lules es divideixen s'observa un marcatge bipolar, situat als dos extrems oposats del material genètic durant la metafase i l'anafase de la divisió mitòtica. Un cop acabada la divisió cel·lular les dues cèl·lules filles contenen altre cop amb un marcatge puntual cadascuna, mantenint la positivitat en el pol cel·lular original de la cèl·lula mare. Cadascun d'aquest pols positius per la Ciclina O augmenta en intensitat a mesura que les cèl·lules s'acosten a la zona més madura del cartílag pel creixement aposicional. Finalment, en el condrocit madur la tinció per la Ciclina O és molt intensa i ocupa la major part del citoplasma ric en glicogen, deixant només l'espai suficient per les vacuoles gegants i un nucli poc visible (**Figura 1 E14,5 G i H**).

Als 14,5 dies de gestació tota la pell que recobreix l'embrió, exceptuant la zona cranial, presenta un marcatge citoplasmàtic de la Ciclina O (**Figura 1 E14,5 I i J**).

Curiosament, a la capa més inferior la Ciclina O presenta una localització puntual i perinuclear, similar a l'observada anteriorment als condrocits immadurs i als feixos cel·lulars dorsal i de l'interior de la cavitat cranial. A mesura que ens apropem a les capes més exteriors de la pell, la Ciclina O sembla estendre's i difondre pel citoplasma. En aquest estadi la Ciclina O no s'expressa a la monocapa de cèl·lules més externes, però sí a les dues monocapes inferiors.

Als 15,5 dies d'edat els embrions mostren un marcatge intens de la Ciclina O a la pell (**Figura 1 E15,5 A**), exceptuant la zona més apical del crani (resultat no mostrat). En aquest estadi es poden diferenciar quatre monocapes cel·lulars a l'epidermis, tres de les quals són positives per la Ciclina O. La monocapa més interna presenta cèl·lules amb poc citoplasma i la Ciclina O es localitza puntualment a un extrem del nucli. Dues monocapes superiors tenen un citoplasma més abundant que conté elevats nivells de Ciclina O distribuïda de forma més o menys difusa. La capa més externa conté cèl·lules molt planes i mostren un contingut clarament nul per la Ciclina O.

A les vèrtebres ja formades desapareix el fort marcatge observat inicialment en el cartílag (**Figura 1 E14,5 H vs E15,5 A**), i ara es poden observar algunes llacunes buides que passaran a ser ocupades pels osteoblasts encarregats de transformar el cartílag hialí en os (**Figura 1 E15,5 A**).

A les zones intervertebrals apareixen cadenes cel·lulars positives per la presència de la Ciclina O molt similars a les monocapes cel·lulars observades en les parets de la cavitat abdominal (**Figura 1 E15,5 A asterisc**). Les cèl·lules d'aquestes zones són arrodonides amb un nucli circular i formen cadenes d'una vèrtebra a la següent (**Figura 1 E15,5 B**). En una minoria d'aquestes cèl·lules s'observa un marcatge puntual perinuclear dèbil, però la majoria tenen un marcatge citoplasmàtic fort que només deixa lloc a una gota lipídica de tamany similar a l'observat en els condrocits (**Figura 1 E14,5 H**).

Reseguint el trajecte de la columna vertebral per la zona dorsal de l'embrió també s'identifiquen feixos cel·lulars marcats positivament per la Ciclina O (**Figura 1 E15,5 A fletxes**). En aquests feixos es poden diferenciar dos tipus de zones respecte la posició de cada vèrtebra: una zona superior (**S**) i una zona inferior (**I**) (**Figura 1 E15,5 C fletxes**). A les zones superiors (**S**) la Ciclina O presenta un marcatge citoplasmàtic difús en fibres que contenen cèl·lules aplanades i allargades amb nuclis fusiformes, i amb una disposició en fila simulant cadenes cel·lulars amb els citoplasmes fusionats. La morfologia cel·lular i la localització de la Ciclina O en aquestes cèl·lules és molt similar als feixos musculars dorsals observats el dia 13,5 (**Figura 1 E13,5 B**). A les zones inferiors (**I**) aquestes files de cèl·lules aplanades semblen perdre la qualitat de sincici i es transformen en cèl·lules individuals més o menys allargades, amb petites gotes lipídiques i amb un marcatge citoplasmàtic de la Ciclina O menys difús i més intens a la zona perinuclear. Mostrant un marcatge i un fenotip més similar a les cèl·lules de la zona intervertebral.

Finalment, a la zona de la pell que recobreix l'ull s'observa un marcatge més fort que en estadis anteriors (**Figura 1 E14,5 E i C vs E15,5 D**). Com s'ha dit previament, l'epiteli de la pell de l'embrió és continu amb l'epiteli intern de les parpelles, i és en aquest punt d'unió on es concentra la major part del marcatge de la Ciclina O.

Entre l'epiteli intern de les parpelles i la còrnia es forma una cavitat revestida per una monocapa de cel.lules positives per la Ciclina O i provinents d'aquests dos epitelis originaris de la pell, (**Figura 1 E15,5 D**). Sota aquesta cavitat ocular i prop de l'epidermis s'observen algunes vesícules primordials dels pèls sensitius del bigoti. Algunes d'aquestes encara estan en plena formació i en íntim contacte amb les tres capes de la pell fortament marcada per la Ciclina O.

2.2 Patró de cèl.lules en proliferació en el desenvolupament de l'epidermis, l'aorta dorsal, el cartílag i la zona de les parpelles.

Per diferenciar les cèl.lules en divisió de les cèl.lules postmitòtiques s'ha utilitzat el marcador de proliferació Ki67. L'ús d'aquest marcador permet diferenciar les capes metabòlicament actives de les capes més diferenciades de l'epidermis al llarg del desenvolupament:

Als 12,5 dies de gestació l'epidermis està formada per dues capes basals de cèl.lules proliferants amb elevats nivells de Ki67, i una monocapa externa pràcticament imperceptible de cèl.lules no proliferants (**Figura 2 A; A i B**).

Als 13,5 dies són quatre les monocapes basals de cèl.lules en proliferació i segueix havent-hi una monocapa externa de cèl.lules aplanades postmitòtiques (**Figura 2 A; C i D**).

El pas cap als 14,5 dies de gestació comporta grans canvis en l'epidermis, ja que s'observen dues monocapes basals de cel.lules proliferants i tres monocapes externes negatives per Ki67. La monocapa més externa de les no proliferants segueix mantenint un fenotip més aplanat, ocupant l'espai proporcional al de tres cèl.lules basals (**Figura 2 A; E i F**).

Als 15,5 dies de gestació es mantenen les dues monocapes de cèl.lules proliferants basals i s'observen de tres a quatre monocapes de cèl.lules no proliferants dependent de la zona de l'embrió. La més externa d'aquestes manté el seu fenotip allargat i aplanat característic (**Figura 2 A; G i H**). En la zona d'unió de la monocapa més externa amb la monocapa contigüa inferior s'observa un marcatge de Ki67 probablement inespecífic, ja que no es correspon a cap nucli o citoplasma cel.lular, sinó simplement a la zona d'unió intermitja entre aquestes dues monocapes.

Com hem vist anteriorment, la Ciclina O s'expressa en l'epidermis de la major part de l'embrió de forma clarament visible a partir del dia 14,5 de gestació. Curiosament, aquesta proteïna també s'expressa a l'epiteli de l'aorta dorsal, situada a la zona rostral de la base del crani (177). Aquesta expressió comença a ser perceptible el dia 13,5 de gestació i és molt elevada al dia 15,5 (**Figura 2 B; C i F**). Per contra, el marcatge amb Ki67 mostra com aquestes cèl.lules epitelials són altament proliferants al dia 13,5 (**Figura 2 B; A i B**), però l'expressió de Ki67 disminueix al dia 15,5, indicant una disminució simultània de la seva activitat proliferativa (**Figura 2 B; D i E**).

Els nivells de la Ciclina O incrementen en la maduració del cartílag i en l'arrest de les seves cèl.lules en un estat postmitòtic abans de la seva degeneració. Com és d'esperar, els nivells de Ki67 són elevats als condroblasts de la zona immadura del cartílag, on es dona el creixement aposicional i intersticial, i disminueixen fins a ser nuls als condrocits de la zona madura del cartílag, on no hi ha creixement i la degeneració posterior permetrà l'ossificació del cartílag per part dels osteoblasts. (**Figura 2 C; A**).

La zona epidèrmica que hi ha entre les dues parpelles és contínua amb les capes més externes de l'epidermis i com s'ha vist anteriorment, s'hi expressen elevades quantitats de Ciclina O. Com en les capes més externes de l'epidermis, la zona interpalpebral de l'embrió de 15,5 dies d'edat tampoc presenta marcatge per Ki67, indicant que és una zona no proliferativa (Figura 2 C; B).

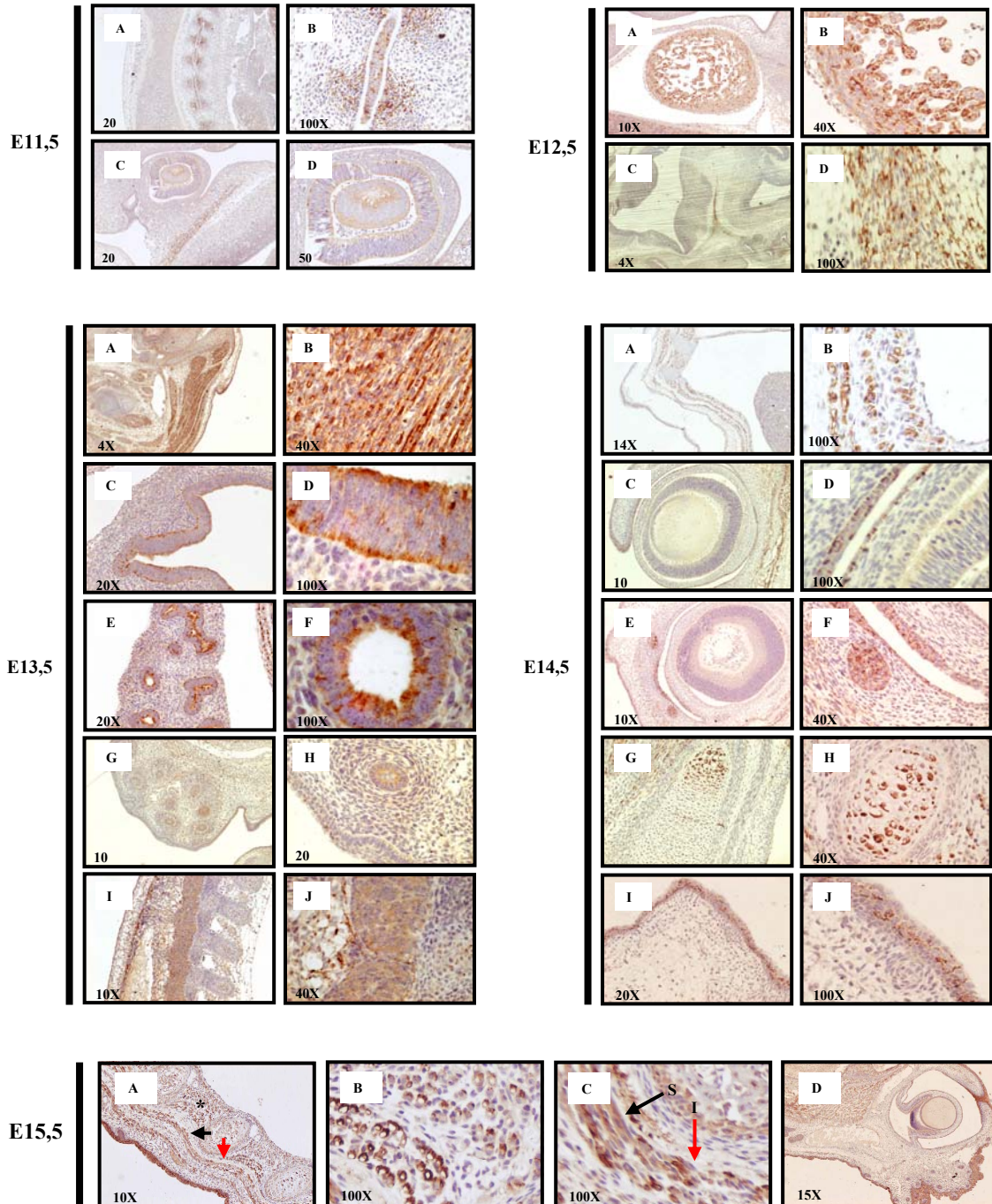


Figura 1. Detecció de la Ciclina O, per immunohistoquímica, en els diferents òrgans i teixits d'embrions sencers de ratolí als dies 11,5 / 12,5 / 13,5 / 14,5 i 15,5 de gestació.

(als embrions de 15,5 dies de gestació l'asterisc * indica la zona intervertebral, i les fletxes negra i vermella indiquen les zones dorsals superior (S) i inferior (I) de la vèrtebra, respectivament)

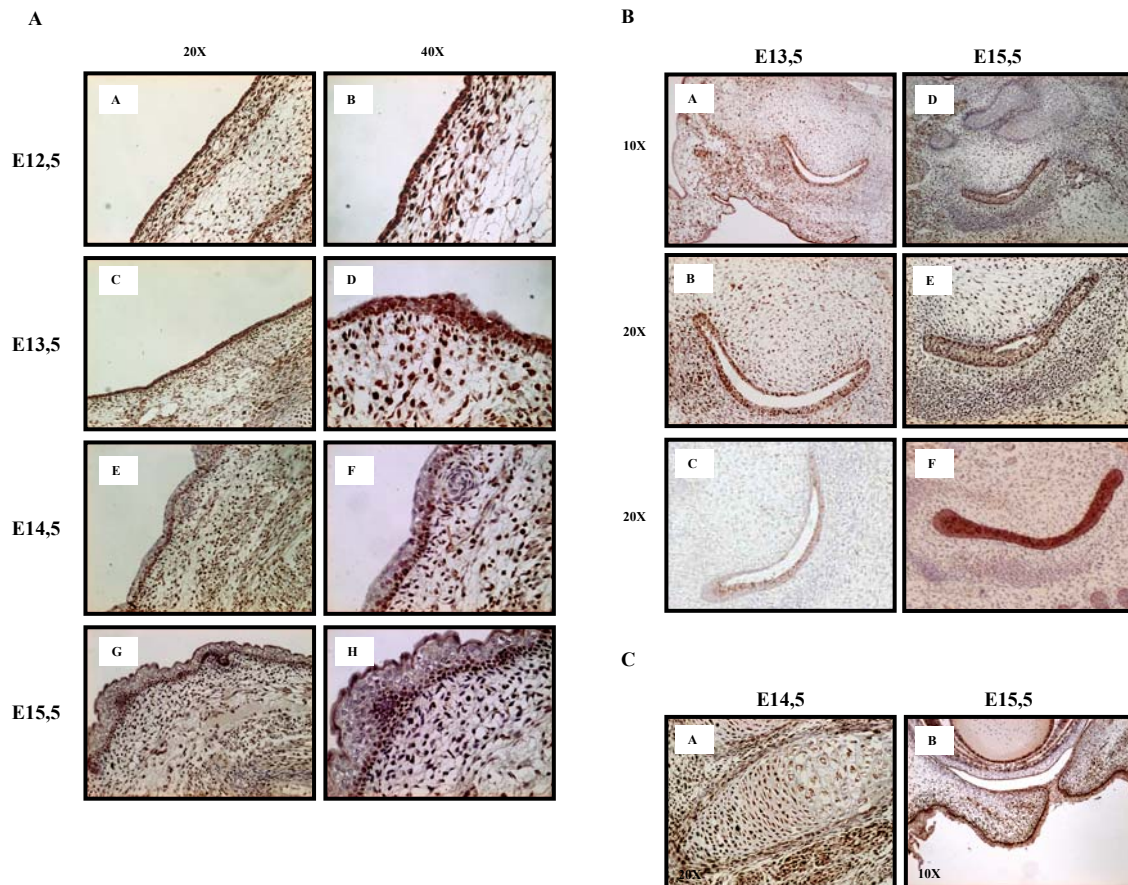


Figura 2. Detecció, per immunohistoquímica, de la proteïna marcador de proliferació, Ki67, a l'epidermis (A), a l'epiteli de l'aorta dorsal en la seva part rostral (B), durant la ossificació endocondrial (C; A) i en la zona epitelial de les parpelles (C; B). A les imatges (B; C i F) es mostra l'increment d'expressió de la Ciclina O del dia E13,5 al dia E15,5 de gestació en l'epiteli de l'aorta dorsal en la seva part rostral.

3 Discussió

Inesperadament, i a diferència dels animals adults, la Ciclina O s'expressa en elevades quantitats durant el desenvolupament, suggerint que podria estar involucrada en diferents funcions segons el tipus de teixit.

3.1 Expressió de la Ciclina O al cartílag hialí i en la ossificació endocondrial

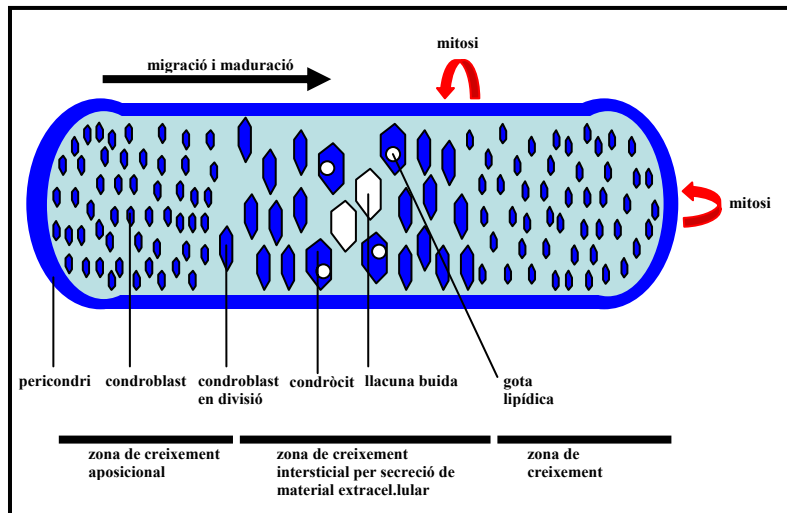
La presència de la Ciclina O en el cartílag hialí incrementa a mesura que el cartílag madura i això fa que en termes generals s'observin uns nivells més elevats de la Ciclina O en els embrions més desenvolupats.

Durant el desenvolupament dels mamífers el cartílag hialí és abundant i forma el motllo per als ossos llargs, les vèrtebres, la pèlvis i els òssos de la base del crani per un procés d'ossificació anomenat endocondrial. En mamífers ja adults el teixit cartilaginós és relativament poc abundant, però entre els altres tipus de cartílag l' hialí és majoritari i present al septe nasal, la laringe, els anells traqueals, a la superfície de la major part de les articulacions, i a l'extrem esternal de les costelles (406).

Fins al moment, la Ciclina O s'ha detectat abundantment al cartílag hialí dels òssos llargs, les costelles, les vèrtebres, i als òssos de la base del crani dels embrions de ratolí, però encara no s'ha estudiat la seva expressió en els cartílags de l'animal adult.

El cartílag és una forma semi-rígida del teixit connectiu amb una consistència sòlida, però a la vegada flexible, gràcies a la presència de glicoproteïnes amb polisacàrids sulfatats. La formació del cartílag comença amb la diferenciació de cèl.lules del mesènquima donant lloc a les cèl.lules precursors del cartílag anomenades condroblasts (**Esquema 1**). Aquestes començaran a sintetitzar material extracel.lular fibrós desenvolupant la massa cartilaginosa. La secreció d'aquest material emplaçarà cada condroblast a un espai individual, o llacuna, dins el conjunt de la matriu del cartílag. En aquest estat, les cèl.lules pateixen una o dues divisions mitòtiques formant petits grups de cèl.lules madures cada vegada més aïllades pel material extracel.lular. Aquestes cèl.lules madures, anomenades condrocits, són les encarregades de mantenir la integritat del cartílag. Ambdós processos, secreció de material extracel.lular i divisió cel.lular, conformen el creixement intersticial del cartílag.

A la perifèria de la massa cartilaginosa és on els condroblasts estan en estadis més primerencs i en contacte amb teixits més tous. A més del creixement intersticial, la formació del cartílag es dona principalment per un creixement aposicional de la perifèria cap a l'interior. És a l'interior on hi ha la zona més madura del teixit i on trobarem els condroblasts madurs, anomenats condrocits (406).



Esquema 1. Estructura i organització del creixement del cartílag

Les cèl·lules més perifèriques són allargades i tenen el fenotip típic dels fibroblastes. Encara no s'han dividit per formar agrupacions, i així que rebin senyals de creixement començaran la maduració cap a condrocits al mateix temps que migraran cap a l'interior del cartílag empeses pel creixement aposicional (406).

Al citoplasma d'aquestes cèl·lules fibroblàstiques la presència de la Ciclina O és molt dèbil, però detectable de manera puntual a un dels pols perinuclears. A la vegada, aquestes són positives pel marcador Ki67 i per tant, mantenen la capacitat proliferativa. Quan aquests condrocits reben les senyals de creixement i entren en divisió es detecta la presència de la Ciclina O a un segon pol oposat al primer, i entremig, s'observa clarament la placa metafàsica. Les dues cèl·lules filles resultants es separaran en direccions oposades i en aquest estat, la Ciclina O es detecta en cadascuna d'elles mantenint un marcatge puntual i perinuclear similar al de la cèl·lula mare originals abans d'entrar en divisió. Aquesta localització és molt similar a l'observada en els timòcits sense irradiar (veure **Capítol 4, apartat 2.2**). El fet que es dupliqui la presència d'aquest marcatge perinuclear en la mitosi i que es situï en els pols de migració de les dues cèl·lules filles resultants, suggereix que la Ciclina O podria formar part del centriol en les cèl·lules interfàsiques, o arrestades en el cas dels timòcits, i del centrosoma en les cèl·lules en mitosi, organitzant els feixos de microtúbuls que guiaran el posicionament dels cromosomes durant la metafase i la seva migració durant l'anafase i la telofase.

Els condrocits madurs es caracteritzen per tenir un nucli petit amb cromatina dispersa i un citoplasma granular degut a un reticle endoplasmàtic rugós ben desenvolupat. Aquestes cèl·lules ocupen la totalitat de la llacuna i el seu citoplasma és ric en glicogen i gotes lipídiques tan o més grans que el propi nucli. En el cartílag madur els constituents de la matriu extracel·lular estan en renovació constant i per tant, la integritat de la matriu depèn de la viabilitat dels condrocits (406). Malgrat tot, i tal com indiquen els nivells de Ki67, aquests ja no proliferen com els condroblasts immadurs. A mesura que el condroblast migra cap a la zona madura del cartílag observem un increment en la quantitat de la Ciclina O acumulada a un dels pols. Finalment, la Ciclina O s'extén per tot el citoplasma del condrocit, deixant visible només la gota lipídica.

En el procés d'ossificació endocondrial, els condrocits de la massa central s'engrandeixen reabsorbint part de la matriu extracel·lular fibrosa que havien secretat i generen una malla de fines trabècules de matriu de cartílag que serà calcificada. Després

de la calcificació el condrocit es mor i degenera, deixant la seva llacuna lliure (406). La presència massiva de la Ciclina O al citoplasma dels condrocits madurs que ja no proliferen i que estan a punt de morir suggereix que la Ciclina O podria tenir a veure amb aquest procés final de mort cel.lular programada.

En el cartílag, la lenta disposició de cada cèl.lula en grups petits i aïllats per una matriu fibrosa podria estar afavorint l'observació d'un fenomen d'acumulació citoplasmàtica de la Ciclina O en l'apoptòsi que normalment podria ser molt ràpid i dispers. Com a exemple, en el timus i la melsa la pèrdua de la integritat cel.lular en l'apoptòsi avançada (3h i 6h postirradiació) promou la dispersió i dilució del contingut cel.lular pels espais intercel.lulars del teixit, fet que podria dificultar l'observació de l'acumulació citoplasmàtica de la Ciclina O en aquest i altres teixits apoptòtics (veure **Capítol 4, apartat 2.2**).

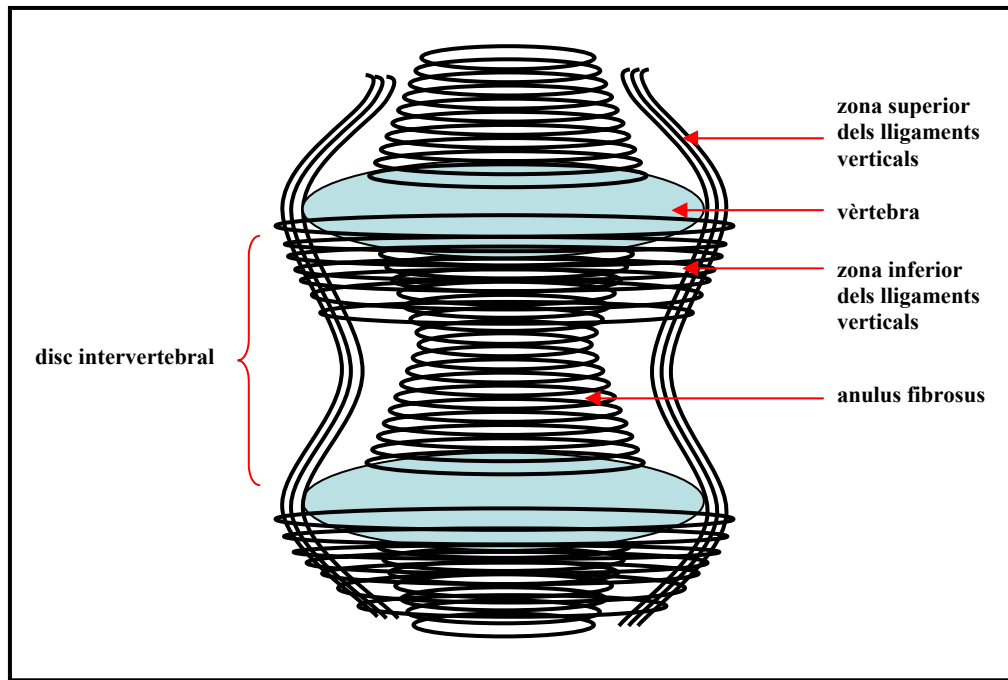
Els espais lliures deixats per la degeneració dels condrocits seran ocupats per cel.lules mesenquimals que es transformaran en osteoblasts i medul.la òssia, respectivament. Els osteoblasts formaran una capa de cèl.lules a la superfície calcificada capaç d'iniciar la formació d'os. En els embrions de 15,5 dies d'edat disminueix el número de cèl.lules amb una expressió elevada de la Ciclina O a l'interior dels cartílags de les vèrtebres, al mateix temps que s'observa un increment en el número de llacunes lliures. Aquest fet indica que després de l'elevada expressió de la Ciclina O en les últimes fases de maduració dels osteòcits, aquests degeneren i es perd totalment la seva expressió.

3.2 Expressió de la Ciclina O al cartílag fibrós

Les vèrtebres estan unides a través de lligaments específics, anomenats discs intervertebrals, que permeten el moviment de la columna i a la vegada mantenen una forta unió entre les vèrtebres (**Esquema 2**).

Cada disc intervertebral està format per discs concèntrics de fibrocartílag anomenats *anulus fibrosus* (406). Un tall sagital de la columna mostra com aquests lligaments estan disposats forma de cadenes cel.lulars paral.leles d'una vèrtebra a l'altra (**E15,5 A i B**).

Cada disc de fibrocartílag està format per capes alternants de cartílag hialí amb condrocits i capes primes de fibres de col.lagen denses orientades en la direcció de l'estrès funcional a que s'hagin de sotmetre (406). Aquesta morfologia explica l'alternança observada entre cadenes de condrocits amb gotes lipídiques citoplasmàtiques marcats positivament per la Ciclina O, i capes negatives més fibroses que contenen alguns nuclis cel.lulars a les zones intervertebrals.



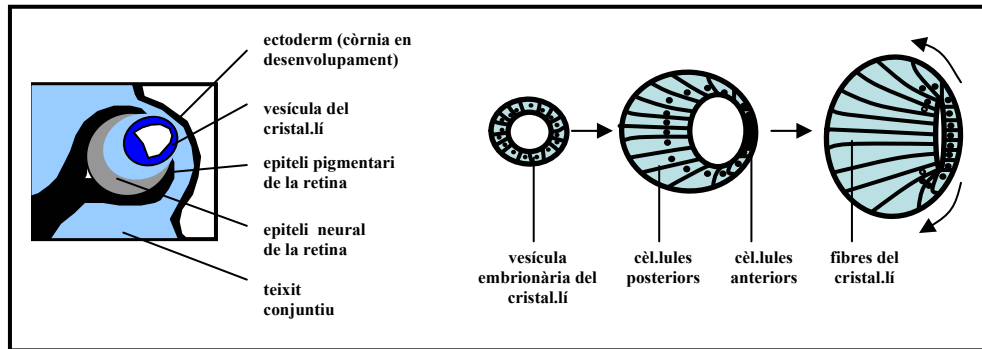
Esquema 2 Representació dels lligaments de cartílag fibrós entre les vèrtebres

Aquests discs intervertebrals estan reforçats perifèricament per lligaments verticals que cobreixen i protegeixen les vèrtebres exteriorment (406). Segons la seva morfologia i el patró d'expressió de la Ciclina O aquests lligaments verticals els hem classificat en fibres de les zones dorsals superiors i inferiors respecte cada vèrtebra (**E15,5 A i C**). Mentre les zones superiors mostren una morfologia fibrosa, oferint resistència a l'estrès en la mateixa direcció que la columna vertebral i amb una tinció elevada i difusa de la Ciclina O, les zones inferiors d'aquests feixos semblen estar formades per condrocits més arrodonits i amb una tinció més localitzada de la Ciclina O. Ambdues morfologies i patrons d'expressió de la ciclina es podrien explicar simplement pel fet d'adoptar una disposició longitudinal o una disposició perpendicular a la columna, respectivament (**Esquema 2**). En ambdós casos es tracta de condrocits del cartílag fibrós amb nivells de Ciclina O que semblen partir d'una localització puntual perinuclear i incrementen citoplasmàticament a mesura que els condrocits maduren i fabriquen vacuoles lipídiques, tal com s'ha observat també en les monocapes cel·lulars de la paret abdominal.

El cartílag fibrós no pateix el fenomen d'ossificació, de manera que en aquest cas l'expressió de la Ciclina O no sembla tenir cap correlació amb la degeneració cel·lular necessària per la formar òssia posterior. Malgrat tot, no es pot descartar que la Ciclina O intervingui en un procés de mort cel·lular programada facilitant la renovació dels condrocits que ja han patit suficients nivells d'estrès físic.

3.3 Expressió de la Ciclina O durant la formació del cristal·lí

El cristal·lí es forma a partir d'un plegament de l'ectoderm epitelial en contacte amb la regió de la vesícula òptica en desenvolupament (5). En aquest punt l'ectoderm s'engrandeix, s'invagina i finalment es comprimeix formant una capa epitelial al voltant d'una cavitat central, tot junt anomenat vesícula embrionària del cristal·lí (**Esquema 3**).



Esquema 3. Desenvolupament del cristal·lí en l'ull dels vertebrats

Les cèl·lules de la regió posterior de la vesícula, orientades vers la retina, sintetitzen cristal·lina, la proteïna característica del cristal·lí. Durant el procés de síntesi de la cristal·lina aquestes cèl·lules s'allarguen extraordinàriament i es diferencien en fibres del cristal·lí. Els nuclis es disposen a la zona frontal, contrària a la retina, i es van desintegrant mentre la síntesi proteica s'atura. Tot i que la major part de les fibres es formen durant les etapes embrionàries, en l'individu adult es segueixen formant fibres noves encara que a una velocitat inversament proporcional a l'edat (5).

A l'estadi embrionari d'11,5 dies s'observen els fenòmens d'engrandiment de les cèl·lules posteriors de la vesícula i com els nuclis d'aquestes fibres migren cap a la regió contrària a la retina. Abans que els nuclis degenerin la Ciclina O es detecta de forma difusa al citoplasma allargat de les fibres, al mateix temps que la cèl·lula sintetitza la proteïna cristal·lina. Així, com en el cas del cartílag hialí, la Ciclina O es detecta just abans d'un procés de degeneració cel·lular en el que pot estar implicat. L'objectiu d'aquest procés és aconseguir un acúmulo de cèl·lules llargues i compactades, en forma de fibres mortes de cristal·lina, constituint un cos refractari gruixut. Aquest conjunt de cèl·lules mortes s'observa als 14,5 dies de gestació, amb uns nivells de la Ciclina O que ja són molt baixos, o inexistents.

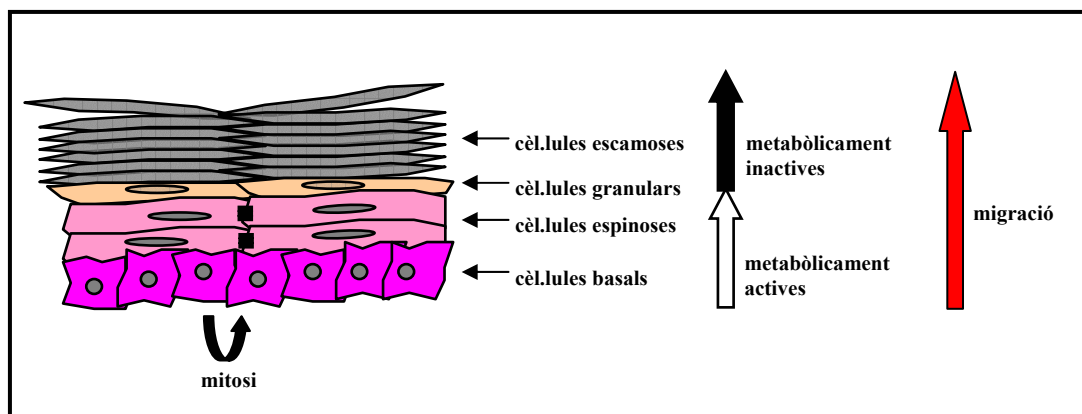
La zona anterior de l'epitel·li de la vesícula, orientada vers l'exterior de l'embrió, està formada per una capa de cèl·lules epitel·lials cúbiques. Aquestes cèl·lules no pateixen modificacions dràstiques, però de la seva divisió en depèn el creixement de la lent, ja que a mesura que es divideixen seran empeses lateralment desplaçant les cèl·lules més laterals cap a la zona posterior (5). La Ciclina O també és present al citoplasma d'aquestes cèl·lules epitel·lials frontals, tot i que en menors quantitats.

A la zona posterior aquestes cèl·lules patiran les transformacions descrites per donar lloc a noves fibres de cristal·lina. Aquestes aturaran la seva divisió cel·lular mentre augmenten la síntesi de cristal·lina fins que el nucli degeneri (5). Al mateix temps s'observa un increment dels nivells de Ciclina O, suggerint que els nivells de la Ciclina O van incrementant a mesura que les cèl·lules frontals són desplaçades cap a la part posterior. En aquest cas, igual que en el cartílag hialí, els nivells de la Ciclina O correlacionen amb els fenòmens de degeneració cel·lular en els quals potser participa. Independentment de la seva possible funció proapoptòtica, no es pot descartar que aquesta proteïna intervingui també en els canvis morfològics necessaris per la transformació cel·lular, dirigint per exemple la reorganització del citoesquelet.

3.4 Expressió de la Ciclina O a l'epidermis

L'epidermis és un epitelí pluriestratificat on les cèl.lules, a mesura que es van diferenciant, es desplacen des del lloc d'origen vers l'exterior en direcció perpendicular al pla de la capa cel.lular (5,406). Tant l'epitelí bronquial, com la capa epidèrmica de la pell, i el revestiment epitelial del tub digestiu, són teixits que presenten un contacte directe i perjudicial amb l'ambient extern. Especialment a la pell i al tub digestiu, el contacte amb el medi extern implica l'agressió de les cèl.lules diferenciades i madures més descobertes i la seva substitució per la proliferació de cèl.lules menys diferenciades que es troben en zones més profundes i protegides. En ambdós casos hem observat l'expressió de la Ciclina O durant les fases prèvies a l'exposició pels agents agressors externs (veure **Capítol 5, apartat 2.1**).

L'epitelí pluriestratificat de l'epidermis de mamífers adults està format majoritàriament per cèl.lules capaces de sintetitzar queratina, anomenades queratinòcits (**Esquema 4**). Aquestes cèl.lules canvien el seu aspecte d'una capa a una altra. Les que es troben a la capa més interna, anomenades cèl.lules basals, són les que presenten un nombre més elevat de mitosis. Per sobre de les cèl.lules basals es troben unes quantes capes de cèl.lules espinoses, anomenades així pels nombrosos desmosomes que connecten amb les cèl.lules veïnes a través de feixos de queratina. Per sobre de la capa espinosa hi ha la capa granular, on les cèl.lules perden els nuclis i els seus orgànuls i es converteixen en cèl.lules escamoses queratinitzades. La capa granular marca la frontera entre la zona profunda i metabòlicament activa (positiva pel marcador Ki67) i la zona externa de l'epidermis formada per cèl.lules mortes (negatives per Ki67). Aquestes cèl.lules més externes queden reduïdes a escames completament planes i allargades, fins arribar a ocupar superficialment l'àrea corresponent a unes 10 cèl.lules de la base de l'epidermis (5). Les cèl.lules escamoses estan plenes de queratina empaquetada de manera densa i s'apilen en forma de columnes hexagonals ordenades i entreligades pels extrems. Les més externes acabaran separant-se de la pell i seran arrossegades per fenòmens fricatus, o simplement endutes per l'aire en forma de pols (5).



Esquema 4. Representació de l'estructura de l'epidermis

Al dia 13,5 de gestació l'epidermis ja conté una monocapa interna de cèl.lules mare i dues o tres capes superiors formades per cèl.lules més compactes, simulant el que serà la capa espinosa rica en desmosomes. A la vegada, les cèl.lules de la capa més externa adopten un forma plana i allargada, i algunes d'aquestes ja no presenten nucli. En aquest

estadi, el marcatge amb Ki67 detecta la capacitat proliferativa en totes les capes, excepte la més externa. La Ciclina O s'aprecia en forma de punt perinuclear gairebé imperceptible a la monocapa de les cèl.lules més basals, probablement al centriol.

Als 14,5 dies de gestació, la proliferació s'ha reduït a les dues monocapes basals, on es manté el marcatge puntual de la Ciclina O. A mesura que aquestes migren a capes més externes la Ciclina O es localitza als citoplasmes comprimits de les cèl.lules espinoses riques en desmosomes. Curiosament la capa més externa de cèl.lules escamoses mortes són negatives per la Ciclina O.

Als 15,5 dies d'edat la pell de l'embrió encara no està totalment formada i no es poden observar les capes epitelials en totes les seves característiques adultes. Malgrat tot, es mantenen les dues monocapes basals proliferants amb un patró puntejat de la Ciclina O, i incrementa el número de capes no proliferants amb un marcatge intens de la Ciclina O citoplasmàtica. A la capa més externa de cèl.lules escamoses no es detecta la Ciclina O.

A l'epidermis, de manera molt similar a les vellositats de l'intestí prim (veure **Capítol 5, apartat 2.1**), als condrocits dins les llacunes del cartílag i a les cèl.lules del cristal·lí abans de convertir-se en fibres mortes, la Ciclina O citoplasmàtica sembla acompanyar els queratinòcits a partir del moment que deixen de proliferar i comencen el seu transcurs final cap a la seva degeneració.

Aquests resultats suggereixen que la Ciclina O pot tenir un paper iniciador de la mort cel·lular programada comú en aquests quatre tipus diferents de teixits. Aquesta hipòtesi es veu reforçada per la presència de la Ciclina O a les cèl.lules epitelials de la zona interpalpebral. Aquesta fina capa de cèl.lules epitelials no proliferatives conté elevats nivells de Ciclina O citoplasmàtica que no semblen correspondre a cap funció metabòlica vital per a les cèl.lules. Aquestes només ofereixen una protecció física de l'ull enfront l'exterior i aniran degenerant, possiblement a través d'una mort programada mediada per la Ciclina O, fins desaparèixer en els primers dies de vida extrauterina.

Independentment de la funció proapoptòtica de la Ciclina O, la hipotètica localització centriolar observada inicialment en les capes més profundes de l'epidermis no descarta la implicació d'aquesta proteïna en la organització dels microtúbuls de la cèl.lula. Aquesta funció podria adquirir certa importància en l'ordenació de la disposició i migració cel·lular, en el creixement per aposició tal com també s'ha vist en el cartílag hialí, en les fibres del cristal·lí, i en la disposició en fibres del cartílag fibrós.

3.5 Expressió de la Ciclina O al sistema nerviós perifèric

A partir del dia 10,5 la Ciclina O es detecta fortament a diferents feixos cel·lulars de la cavitat cranial (**E11,5 C** i **E12,5 C** i **D**). Aquestes cèl.lules no pertanyen pròpiament al sistema nerviós central, sinó que probablement són condrocits constituents dels primordis dels cartílags que formaran els òssos de la base del crani i cèl.lules mesenquimals que s'interposen entre el cartílag i la massa cerebral (177).

A la mateixa etapa de desenvolupament, però amb una intensitat més moderada, la Ciclina O es detecta a les cèl.lules de la notocorda (**E11,5 B**) mostrant un patró perinuclear en algunes, mentre en d'altres s'observa una tinció citoplasmàtica més abundant amb una funcionalitat totalment desconeguda. En etapes posteriors també s'observa la presència de la Ciclina O a les arrels dels ganglis dorsals (**E13,5 I** i **J**) amb una expressió moderada i difusa pel citoplàsm i una funcionalitat totalment desconeguda.

3.6 Expressió de la Ciclina O en epitelis i altres estructures

A partir de l'ectoderm es formarà l'epiteli de la vesícula del cristal·lí, de la còrnia, de l'epidermis i del tub neural, del que se'n derivarà l'epiteli neural i pigmentari de la retina (177). La Ciclina O és present a totes aquestes estructures i també a les cèl·lules epitelials que revesteixen els bronquis pulmonars, l'estómac i les parets de l'aorta dorsal. En tots aquests casos la Ciclina O s'observa al citoplasma, preferentment en contacte amb la llum del conducte, i a la part basal de l'epiteli.

De forma totalment especulativa la presència de la Ciclina O a la cavitat de l'estómac i dels bronquis suggereix una funció en la renovació cel·lular i en l'apoptosi, tal com passa en l'epidermis. Aquest tipus d'expressió es manté en l'animal adult i pot ser detectada tan en l'epidermis (resultat no mostrat), com als epitelis intestinals i bronquials (veure **Capítols 5 i 6, apartat 2.1**). Per contra, l'epiteli pigmentari i neural de la retina no estan sotmesos a una agressió física constant que requereixi la permanent renovació del teixit. En conseqüència, l'expressió de la Ciclina O disminueix ràpidament i és pràcticament indetectable al dia 14,5 de desenvolupament.

L'expressió de la Ciclina O a l'epiteli de l'aorta no s'ha estudiat en l'animal adult, però els seus nivells són molt abundants a partir del dia 15,5 de gestació, coincidint amb una disminució de la proliferació cel·lular. Per corroborar la possible correlació entre l'increment de l'expressió de la Ciclina O i la disminució de la proliferació cel·lular seria interessant estudiar altres epitelis i teixits que no estiguin sotmesos a una restructuració morfològica posterior. Aquest podria ser el cas de la major part de les neurones del cervell adult (veure **Capítol 8, apartat 2.1**), i de l'epiteli de l'aorta dorsal, suggerint una funció inhibidora de la proliferació cel·lular per part de la Ciclina O. En el cas de la cavitat cardíaca, com en els condrocits, els queratinòcits, les fibres del cristal·lí, i els enteròcits també sembla haver-hi una correlació entre l'aturada de la proliferació cel·lular i l'expressió de la Ciclina O citoplasmàtica, però els fenòmens de restructuració immediatament posteriors impedeixen desvincular l'expressió de la ciclina amb la inducció de l'apoptosi o mort cel·lular programada. Al dia 12,5 la Ciclina O és present a les cèl·lules internes del cor, potser amb una funció apoptòtica de remodelació de la cavitat. A les etapes més tardanes l'expressió d'aquesta proteïna desapareix i és gairebé indetectable el dia 15,5, quan la morfologia i l'estructura de la cavitat estan totalment finalitzades (177).

A partir del dia 12,5 de gestació, just a la part superior i inferior d'on es situarà la boca, l'epidermis forma invaginacions que donaran lloc a vesícules individuals (**E13,5 G i H**, i **E15,5 D**) identificades com a vesícules primordials dels pèls del bigotí (177). Aquests pèls seran inusualment llargs en l'animal adult, i presentaran una terminació nerviosa a la seva base, fent-los sensibles al tacte, i donant informació immediata de l'entorn a l'animal. Aquest tipus de pèls sensitius es localitzen en agrupacions a zones concretes de l'animal com els bigotis i a la zona del mentó.

El marcatge amb Ki67 demostra que les cèl·lules que formen les vesícules primordials provenen de les cèl·lules proliferants de l'epidermis i segueixen proliferant en capes concèntriques consecutives, augmentant el diàmetre interior (resultat no mostrat). Per contra, les poques cèl·lules que originalment queden a la cavitat interior de la vesícula provenen de les capes externes de l'epidermis i per tant, els seus citoplasmes contenen Ciclina O. Aquestes cèl·lules no proliferen (resultat no mostrat) i probablement hauran

de degenerar i deixar espai pel canal interior del fol·licle pilós, suggerint la implicació de la Ciclina O en l'apoptosi tal com s'observa en l'eliminació de les cèl·lules de la zona interpalpebral.

El dia 13,5 d'edat els embrions mostren uns feixos cel·lulars molt densos a la zona cervical i al llarg del dors (**E13,5 A i B**) que es corresponen amb feixos de cèl·lules musculars (177). Sorprenentment, els nivells de la Ciclina O en aquestes cèl·lules són elevats i la seva observació detallada mostra una localització fibrosa d'aquesta proteïna en la mateixa direcció de l'eix de la cèl·lula, possiblement coincidint amb alguns elements del citoesquelet a partir d'un patró centriolar original. Un patró similar sembla observar-se en les zones superiors dels lligaments de cartílag fibrós dorsal (**Figura 1 E15,5 C**) i malgrat desconèixer la seva implicació en una possible funció proapoptòtica de la Ciclina O, la col·localització d'aquesta proteïna amb els elements del citoesquelet podria indicar una via d'emmagatzematge, o de transport i distribució cel·lular, inhabilitant la proteïna fins al seu correcte emplaçament cel·lular.

3.7 Activitat de p53 i Ciclina O en desenvolupament

Podem dir que els trets comuns en tots els llocs on hi ha activitat transcripcional de p53 són: elevats nivells de l'mRNA de p53, l'acumulació de la proteïna p53 després d'irradiació, i una ràpida resposta apoptòtica a la radiació (108,191).

En els embrions s'observa que la radiosensibilitat a diferents edats ve donada en primera instància pels nivells de mRNA de p53, ja que a partir del dia 13 hi ha una forta disminució d'aquests nivells i es perd la capacitat que tenen els embrions més joves per establir la proteïna p53 i incrementar els nivells d'apoptosi després de la irradiació (108). Els embrions avançats, els individus postnatsals, i més endavant els adults, són cada vegada més resistents a l'apoptosi per radiació, coincidint amb la pèrdua de l'activitat transcripcional de p53 i amb nivells baixos del seu mRNA (108,191). Per contra, la proteïna Ciclina O, i possiblement el seu mRNA, s'acumulen a l'embrió a partir del dia 11,5 i almenys fins al dia 15,5, seguint una cinètica inversa a la de p53. Per tant, tot i que la presència de la Ciclina O correlaciona amb els processos de mort cel·lular programada de l'embrió, particularment en la formació del cristal·lí, la maduració del cartílag i la formació de les cèl·lules escamoses de l'epidèrmis, aquests processos no semblen estar regulats per l'activitat apoptòtica decreixent de p53 durant la gestació.

L'efecte apoptòtic de p53 en els primers dies embrionaris concorda amb el model segons el qual l'apoptosi mediada per p53 elimina les cèl·lules amb anomalies genètiques en les primeres etapes del desenvolupament (109). En canvi, la Ciclina O podria dur a terme processos de mort cel·lular programada independents de p53 permetent la remodelació i maduració de diferents òrgans i teixits seguint un patró espacial i temporalment definit. Això passa molt clarament en la maduració de la vesícula del cristal·lí, la remodelació de la cavitat cardíaca, la remodelació del cartílag en el procés d'ossificació endocondrial o la maduració de l'epidèrmis en les seves capes característiques de l'adult.

Exceptuant el timus, la melsa i l'intestí prim, on es manté una elevada sensibilitat a la mort per radiació, la resta del teixit adults de ratolí presenta uns nivells de mRNA de p53 molt baixos (191). En l'animal adult els nivells de mRNA de la Ciclina O també

són molt baixos, i aquesta proteïna ja no sembla tenir la funció de remodelació estructural i maduració dels teixits observada anteriorment.

En alguns teixits adults (veure **Capítol 4, 6 i 8**) la Ciclina O sembla ser induïda de manera dependent de p53, de forma que en aquesta nova fase p53 i la Ciclina O podrien actuar estretament en els mecanismes proapoptòtics que regulen l'eliminació de les cèl.lules greument afectades pels insults genotòxics.

Un inexplicable fenomen intermig el trobem al SNC adult (veure **Capítol 8**), on hi segueix havent activitat transcripcional i acumulació de p53 després d'irradiació, tot i que el teixit ha madurat transformant-se en radioresistent (108) (253). Curiosament aquest és un dels pocs teixits adults que mostra una expressió constant de la Ciclina O sense funcions proapoptòtiques ni de remodelació aparents.

3.8 Apoptosi p53 dependent i p53 independent

Els embrions de ratolí en estadis primerencs mostren apoptosi dependent de p53 immediatament després del dany al DNA (3, 8 i 24h) a zones concretes del SNC i a la medul.la espinal. En canvi a la major part dels teixits hi ha apoptosi independent de p53 7 dies després d'haver irradiat (108).

S'ha suggerit que el fet que els embrions salvatges no mostrin una segona onada d'apoptosi retardada després de l'apoptosi immediata al SNC i a la medul.la espinal, pot ser degut a que les cèl.lules danyades ja han estat eliminades eficientment a les primeres hores després de la radiació pel mecanisme p53 dependent. En aquest cas, els mecanismes alternatius més lents ja no semblen necessaris.

Curiosament, l'apoptosi independent de p53 afecta a l'ossificació endocondrial, a l'epidèrmis, a l'epiteli pulmonar i de l'estómac, però no es dona al sistema nerviós central. Aquest patró correlaciona amb la presència de la Ciclina O en embrions de la mateixa edat, (15,5 dies), quan els nivells de l'mRNA de p53 ja són molt baixos.

Conjuntament, aquestes dades indiquen que l'apoptosi tardana induïda per radiació i independent de p53 podria ser dependent de la Ciclina O, com sembla ocórrer també en les criptes de l'intestí prim (veure **Capítol 5, apartat 2.2**). Per estudiar la implicació de la Ciclina O en un procés proapoptòtic independent de p53 caldrà comprovar la seva participació en l'apoptosi d'aquests teixits en embrions deficientes per p53 irradiats.

La prevalència d'una d'aquestes dues rutes sobre l'altra en l'animal adult podria dependre del teixit, ja que en alguns casos com el pulmó i el timus l'apoptosi sembla clarament independent i dependent de p53, respectivament. Tot i les preferències clares del timus i el pulmó per una via o per l'altra, en altres teixits la determinació no és tan clara i no es pot descartar la participació simultània dels dos mecanismes en l'eliminació fisiològica de les cèl.lules envellides o danyades.

V. DISCUSSIÓ FINAL

1. Antecedents

L'apoptosi, o mort cel·lular programada, és un procés actiu que mobilitza els recursos cel·lulars amb l'objectiu de mantenir l'homeostasi de l'organisme a expenses del suïcidi de cèl·lules individuals. L'estudi de l'apoptosi i l'estreta vinculació d'aquest procés amb el desenvolupament dels organismes multicel·lulars i l'homeostasi tissular dels organismes adults suggereix una participació important d'aquesta en les patologies originades per la mort cel·lular prematura i en les patologies neoplàsiques en una àmplia varietat d'organismes dins de l'escala evolutiva.

No és d'estranyar que els mecanismes que regulen les funcions cel·lulars redirigeixin la seva maquinària i la seva activitat cap a l'execució de l'apoptosi, ja que aquest és un procés ràpid on la cèl·lula, i fins i tot l'organisme sencer, poden veure compromesa la seva viabilitat de manera inesperada. En aquest sentit s'ha observat que diferents elements reguladors del cicle cel·lular intervenen en la mort cel·lular programada, i a la inversa (181). Almenys, hi ha tres connexions entre l'apoptosi i el cicle cel·lular que cal destacar. En primer lloc, molts dels insults que activen l'apoptosi de la cèl·lula comporten l'activació del gen supressor de tumors *p53*, i com a conseqüència de la seva activitat transcripcional, la repressió del gen *ciclina B1* i la inducció del gen de l'inhibidor $p21^{Cip1}$ (109,195). En segon lloc, s'ha descrit una col·laboració positiva entre la proteïna proapoptòtica Bax i la degradació de l'inhibidor $p27^{Kip1}$, de la mateixa manera que la proteïna antiapoptòtica Bcl-2 inhibeix la degradació de $p27^{Kip1}$ i l'inici de l'apoptosi (119). Finalment, diferents estudis han mostrat un increment de l'activitat d'algunes cdk, especialment Cdk1 i Cdk2, en correlació amb la progressió dels primers estadis apoptòtics (123).

Per estudiar l'activitat cdk responsable de l'apoptosi, la pròpia proliferació cel·lular i la seva activitat cdk associada són elements distorsionadors que actuen en la majoria dels tipus cel·lulars. En el nostre laboratori s'han estudiat els timòcits, el 90 % dels quals no proliferen i en conseqüència no mostren activitat cdk responsable del control del cicle cel·lular. El tractament d'aquest tipus cel·lular amb radiació gamma o glucocorticoides indueix una ràpida apoptosi en la major part de les cèl·lules d'aquest teixit que provoca la mort cel·lular en poques hores. Utilitzant aquests estímuls apoptòtics el nostre grup ha demostrat l'existència d'un increment de l'activitat de la kinasa Cdk2 a mesura que progressa l'apoptosi dels timòcits de ratolí, mentre que l'activitat d'altres kinases reguladores del cicle cel·lular, com Cdk1, és molt baixa o indetectable en aquestes condicions, indicant que possiblement són dispensables (119). Utilitzant la roscovitina com a inhibidor reversible de Cdk2 (240) el nostre grup també ha identificat l'activació d'aquesta kinasa com el primer dels fenòmens detectables en l'apoptosi induïda en un cultiu primari de timòcits. En aquest sistema, l'activitat apoptòtica de Cdk2 precedeix altres marcadors apoptòtics descrits fins ara com l'exposició de la fosfatidilserina de la capa lipídica externa, l'activació de la Caspasa 8, la proteòlisi de Bid, la translocació de Bax a la mitocòndria, la pèrdua de potencial mitocondrial, la formació d'espècies reactives de l'oxigen (ROS), l'alliberació de Citocrom C de la mitocòndria, l'activació de les caspases-9 i -3, i la degradació del DNA (126).

Durant les primeres etapes de l'apoptosi, la maquinària cel·lular i les seves funcions metabòliques i estructurals es mantenen intactes, fet que permet aturar el procés i conservar la viabilitat de la cèl·lula. En les etapes posteriors, la maquinària cel·lular es

dirigeix cap a funcions apoptòtiques al mateix temps que aquestes han començat a alterar la morfologia cel·lular facilitant la fagocitosi posterior per les cèl·lules veïnes.

La identificació de l'activació de Cdk2 com un dels events més apicals de la ruta apoptòtica de timòcits, i probablement també d'altres tipus cel·lulars, fa d'aquesta kinasa una diana terapèutica potencial per tal d'inhibir l'apoptosi associada a diverses patologies degeneratives com el Parkinson i l'Alzheimer, o d'accelerar-la afavorint la supressió dels tumors que s'escapen als programes de mort cel·lular (81,276).

El tractament dels timòcits amb glucocorticoides o amb radiació gamma indueix l'apoptosi a través d'una ràpida degradació de l'inhibidor p27^{Kip1} que podria ser necessària per l'activació de Cdk2 (119). Tanmateix, tot i que els animals deficients per p27^{Kip1} mostren una major activitat de Cdk2 després de l'insult cel·lular, en condicions normals Cdk2 és inactiva i no s'observa un increment basal de l'apoptosi (182), indicant que calen altres factors per desencadenar la seva activitat apoptòtica.

En timòcits els nivells de la proteïna Cdk2 són constants durant l'apoptosi (119), però s'observa una disminució de la fosforilació de la Tyr15 de Cdk2 (resultat no mostrat) indicant l'existència d'un mecanisme d'activació postraduccional que juntament amb la degradació de p27^{Kip1} propicia l'activació apoptòtica de la kinasa. A més d'aquesta regulació de l'activació de Cdk2 comú amb els sistemes proliferants (257), les alteracions en l'activitat específica de Cdk2 són possibles a través d'un reordenament en l'equilibri de les ciclines que habitualment formen els complexos de Cdk2 actius; Ciclina A i Ciclina E. Tanmateix, la mesura de l'activitat kinasa corresponent als complexos amb Ciclina A i E no mostra cap augment durant l'apoptosi dels timòcits, fet que correlaciona amb els nivells baixos d'ambdues proteïnes en aquestes condicions (119). Sorprenentment, en presència d'inhibidors de la transcripció o de la traducció, els tractaments amb radiació gamma o glucocorticoides no induïxen l'activació apoptòtica de Cdk2 ni els events *downstream* descrits en la mort cel·lular induïda dels timòcits, tot i observar-se la degradació de p27^{Kip1} (119) i una disminució en la fosforilació de la Tyr15 (resultat no mostrat). Aquests resultats suggereixen que la síntesi *de novo* de proteïnes és indispensable per l'activació de Cdk2 i l'apoptosi en timòcits.

2. Objectiu principal

Per ampliar el coneixement sobre l'activació de la kinasa Cdk2 en apoptosi, i com a possible diana terapèutica en malalties que requereixin un bloqueig o una activació d'aquest procés, l'objectiu principal d'aquest estudi ha estat identificar el mecanisme activador de la kinasa Cdk2 en l'apoptosi a partir d'un sistema no proliferatiu com són els timòcits. Per iniciar aquest estudi, i com a hipòtesi de partida, s'ha proposat l'existència d'una ciclina induïble en condicions d'apoptosi capaç d'actuar com a subunitat activadora de Cdk2.

3. Identificació de la Ciclina O

Descartant la Ciclina A i E com a activadores de Cdk2 en apoptosi (119), s'ha descrit a la literatura que les Ciclines D poden formar complexos actius amb Cdk2 *in vitro*, però tant la Ciclina D2 com la Ciclina D3 deixen d'expressar-se en el cultiu primari de timòcits, possiblement per la manca de factors de creixement (119). A la vegada, l'expressió d'un tercer membre de la família de les ciclines D, la Ciclina D1, és regulat negativament en els timòcits apoptòtics (171).

Altres estudis han relacionat l'apoptosi induïda per p53 amb un dels seus gens diana, la Ciclina G1. Malgrat tot, els ratolins deficientes per aquesta ciclina són totalment viables i l'apoptosi induïda en els timòcits d'aquests animals no mostra diferències respecte als ratolins WT (180). Estudis més recents han descrit que la funció de la Ciclina G1 és regular negativament p53 a través de l'activació de Mdm2, alhora que s'hipotetitza que la funció desconeguda de dues proteïnes homòlogues, la Ciclina G2 i la Ciclina I, podria ser redundants o similar a la funció de la Ciclina G1 (56).

En els primers experiments d'aquest treball s'ha demostrat que tant la Ciclina G1 com la Ciclina I tenen la capacitat d'interaccionar amb Cdk2 *in vitro* tot i que l'activitat d'aquests complexos és gairebé nul·la, descartant la seva implicació com a activadors de Cdk2 en apoptosi.

Per tal d'aïllar noves proteïnes amb capacitat per interaccionar amb Cdk2 en condicions d'apoptosi es va realitzar un assaig de doble híbrid utilitzant la proteïna Cdk2 com a esquer i una llibreria de cDNA obtinguda a partir de timòcits en condicions d'apoptosi (4h postirradiació amb una dosi de 5Gy). Malgrat l'èxit de la tècnica, entre els clons obtinguts no s'identificà cap activador de la kinasa Cdk2 (resultat no mostrat). Aquest resultat negatiu podria indicar de que l'expressió de l'activador de Cdk2 només es dona a l'inici del procés apoptòtic, mentre que podria ser nul·la o quedar greument reduïda en estadis més avançats (4h postirradiació). Així, és possible que l'activador de Cdk2 actui només com inductor del procés de mort cel·lular programada en timòcits, però no sigui necessari pel manteniment i finalització d'aquest procés.

Per seguir endavant amb l'objectiu d'aïllar l'activador apoptòtic de Cdk2 es va optar per identificar nous membres de la família de les ciclins del genoma humà basant-nos amb la conservació de la seqüència *cyclin box* característica d'aquesta família (279). Mitjançant la comparació per ordinador de la seqüència *cyclin box* de la Ciclina A2 humana amb el genoma humà recentment seqüenciat s'identificà un nou membre de la família de les ciclins codificat per tres exons localitzats al locus 5p15.2-p13.1.

Amb anterioritat, un transcrit provinent del mateix locus genòmic (5p15.2-p13.1) i amb certa homologia amb la família de les ciclins ja fou descrit com a UDG cyclin-like (M87499) (260). La regulació i la funció del seu producte peptídic han estat estudiades (102,261,262), i finalment aquest gen ha estat catalogat com a gen *ciclina O* seguint l'ordre alfabètic de la família de les ciclins (268) i consolidat en publicacions recents com a nou membre dins d'aquesta àmplia família (103,228,267).

Malauradament, la seqüència del transcrit (M87499) (260) és incorrecte, ja que no respecta la seqüència publicada del genoma humà, de manera que en el nostre laboratori proposem el nou gen indentificat en el mateix locus com a veritable gen *ciclina O*.

L'existència del gen *ciclina O* identificat pel nostre grup queda demostrada observant la fidelitat amb que respecta la seqüència del genoma humà, l'existència de gens ortòlegs en altres espècies de vertebrats (mamífers, amfibis i peixos) i l'existència de nombroses ESTs que evidencien l'expressió d'un gen en el locus 5p15.2-p13.1 humà amb la mateixa estructura del gen de la Ciclina O identificat. Tanmateix, als bancs de dades hi ha múltiples ESTs disponibles que provenen d'aquest mateix locus però que presenten una homologia parcial per algun dels exons que codifiquen per la Ciclina O identificada en el nostre laboratori. Aquests transcrits, fruit de l'expressió de gens veïns o de processos de *splicing* alternatiu del gen *ciclina O*, no semblen tenir rellevància com a membres funcionals dins la família de les ciclins, ja que no conserven la seqüència *cyclin box* responsable de la interacció i activació dels membres de la família cdk.

4. Clonatge de la Ciclina O

A partir de la llibreria de cDNA utilitzada anteriorment per l'assaig de doble híbrid s'aconseguí clonar la seqüència de ratolí codificant de la Ciclina O mitjançant múltiples rondes d'amplificació per PCR a partir d'oligonucleòtids homòlegs a les regions 5' i 3' codificants. Aquest experiment confirmà la presència del transcrit de la Ciclina O en els timòcits en avançat estat apoptòtic (4h postirradiació), tot i que a uns nivells tan baixos com els observats a partir de la llibreria de cDNA control provinent de les mateixes cèl.lules abans de ser sotmeses a irradiació (resultats no mostrats).

5. Efecte de la Ciclina O en transfeccions transitòries

Per confirmar la hipòtesi de la Ciclina O com a subunitat activadora de Cdk2 en apoptosi s'iniciaren experiments *in vitro* amb la proteïna Ciclina O recombinant. Mitjançant experiments d'interacció *in vitro* s'ha demostrat que la Ciclina O pot actuar com a subunitat activadora de la kinasa Cdk2, tot i que no es pot descartar l'activació simultània d'altres kinases similars, com Cdk1 i Cdk5. Posteriorment, mitjançant transfeccions transitòries de la Ciclina O en cèl.lules HEK293 també s'ha demostrat que la Ciclina O pot actuar com a subunitat activadora de la kinasa Cdk2 *in vivo*. En aquest cas, la sobreexpressió de la Ciclina O en cèl.lules HEK293 provoca un augment significatiu del número de cèl.lules apoptòtiques i una pèrdua de l'adherència cel.lular a la placa de cultiu, resultats que confirmen la hipòtesi inicial i que posicionen la Ciclina O com a candidat en la regulació de l'activitat apoptòtica de Cdk2.

6. Efecte de la Ciclina O en clons estables

Malgrat la letalitat de la Ciclina O en condicions de sobreexpressió s'han pogut generar clons cel.lulars en cèl.lules HEK293 humanes que mantenen una expressió constitutiva estable de la Ciclina O, i clons induïbles mitjançant un sistema tet/ON en cèl.lules Baf3 de ratolí. En ambdós casos, la generació de clons control transfectats amb el vector buit ha estat més ràpida i eficient que la generació dels clons positius per l'expressió de la Ciclina O. Aquest fenomen suggereix un efecte letal de la Ciclina O també en els clons induïbles, ja que en absència d'inducció aquests clons mantenen una activitat kinasa basal associada a la Ciclina O que podria desencadenar un efecte similar a l'observat en la generació dels clons d'expressió constitutiva. Malgrat la baixa viabilitat dels clons positius per l'expressió de la Ciclina O ambdós tipus cel.lulars mostren l'expressió de la Ciclina O i l'activitat kinasa associada d'aquesta nova proteïna sobre la Histona H1. Així doncs, tot i l'activitat de la Ciclina O, podríem considerar que l'existència dels clons positius per l'expressió d'aquesta ciclina és el resultat d'una selecció clonal que només ha permès la viabilitat d'aquells els clons que s'han adaptat a l'expressió de la Ciclina O.

Curiosament, en ambdós tipus cel.lulars l'expressió de la Ciclina O comporta un retard en el creixement del cultiu cel.lular respecte els clons control. De l'anàlisi dels clons induïbles se'n dedueix que el menor increment en el número de cèl.lules d'un cultiu que expressa la Ciclina O respecte un cultiu control es deu principalment a un retard en la sortida de la fase S. Com a conseqüència, el cicle cel.lular de les cèl.lules que expressen la Ciclina O té una durada de 25h, mentre que en les cèl.lules Baf3 control dura 20h. Actualment no coneixem el mecanisme pel qual la Ciclina O pot alterar la progressió del cicle cel.lular, però l'acció de Cdk2 sobre les histones podria

tenir conseqüències en l'estructura de la cromatina afavorint l'acció dels factors de transcripció com E2F1 (71). Aquest factor de transcripció és responsable de l'expressió de la Ciclina E i de Cdc25A, la sobreexpressió dels quals pot bloquejar la progressió de la fase S cap a G2 produïnt un retard en la sortida de la fase S (69). La fosfatasa Cdc25A segueix un mecanisme de degradació complex i poc conegut que sembla requerir la participació de Cdk2 (87). Un augment de l'activitat d'aquesta kinasa per l'expressió de la Ciclina O podria comportar una disminució dels nivells de Cdc25A, bloquejant la progressió de la fase S i produïnt també un retard en la progressió de la fase S.

Tot i l'alteració del cicle cel.lular, ja hem dit anteriorment que en condicions normals l'expressió de la Ciclina O en els clons de cèl.lules Baf3 no altera la viabilitat cel.lular. Sorprenentment, en condicions d'estrès la presència de la Ciclina O mostra clarament un efecte protector. Aquest efecte s'ha pogut comprovar amb tres estímuls apoptòtics diferents per les cèl.lules Baf3 com són: la manca de la interleucina IL3, l'addició d'un agent desestabilitzador dels microtúbuls i la inducció de lesions al DNA amb radiació gamma. Aquest últim tractament evidencia el comportament apoptòtic més divergent entre els clons que expressen la Ciclina O i els clons control. L'aprofundiment de l'estudi en aquestes condicions mostra com el *checkpoint* de G2 induït per la radiació gamma actua simultàniament en ambdós tipus de clons, produïnt una aturada del cicle cel.lular a la fase G2 al cap de 12h. Posteriorment, mentre els clons control són capaços de sortir ràpidament de G2 fins aturar-se i morir majoritàriament a la fase G1, els clons que expressen la Ciclina O es mantenen durant més temps a la fase G2 inicial i lentament prossegueixen cap a la fase G1 i S del cicle cel.lular, mostrant una acumulació menor de cèl.lules apoptòtiques.

Així doncs, hem de considerar que la selecció clonal que pot permetre la viabilitat cel.lular en presència de la Ciclina O no només altera el possible efecte proapoptòtic d'aquesta proteïna, sinó que el podria revertir convertint-lo en l'efecte antiapoptòtic observat.

7. Expressió de la Ciclina O en l'apoptosi induïda de timòcits

Dels efectes antiapoptòtics de la Ciclina O en els clons cel.lulars generats se'n dedueix que la Ciclina O pot formar complexos actius amb Cdk2 *in vivo*, però els experiments d'expressió transitòria en cèl.lules HEK293 suggereixen que la seva funcionalitat és proapoptòtica.

Per confirmar la hipòtesi inicial, on s'estableix la Ciclina O com a subunitat activadora de Cdk2 en apoptosi, s'estudià l'expressió d'aquesta nova ciclina en timòcits apoptòtics. El clonatge de la Ciclina O ja evidencià uns nivells d'expressió d'aquest gen molt baixos en estadis avançats de mort cel.lular (4h postirradiació), fet que suggerí una finestra d'expressió ajustada a les etapes més inicials d'apoptosi. Així doncs, els experiments realitzats posteriorment s'han centrat en l'etapa inicial de l'apoptosi i han mostrat com la disgregació del timus *per se* ja provoca una inducció de l'expressió de la Ciclina O de més del 100% respecte els nivells basals gairebé indetectables en el timus sencer. El tractament posterior d'aquest cultiu primari de timòcits amb irradiació gamma o dexametasona és incapaç d'induir una segona onada d'expressió de la Ciclina O. Implícitament, aquests resultats mostren com la preparació de qualsevol cultiu primari de timòcits a partir de la disgregació del timus implica l'expressió immediata de la Ciclina O i les seves conseqüències, d'entre elles possiblement la mort cel.lular. De fet, les cèl.lules d'un cultiu primari de timòcits moren a les poques hores pel simple fet

de perdre les propietats del complex i desconegut entorn tímic. Aquest procés, anomenat apoptosi espontània (126,229), podria ser iniciat per la manca de factors de creixement, la pèrdua dels contactes cèl.lular-cèl.lular, o per un fenomen d'anòxia (115,384). Tots ells, events que podrien provocar la inducció immediata de l'expressió de la Ciclina O.

Davant la impossibilitat d'induir una segona onada de l'expressió de la Ciclina O en un cultiu primari de timòcits s'ha estudiat la inducció de la Ciclina O en l'apoptosi induïda per radiació gamma (10Gy) de l'animal *in vivo*. Aquests estudis mostren com a les 3h postirradiació el gen de la Ciclina O experimenta una inducció de fins al 1000%, mentre que a les 4h postirradiació s'observa una correlació positiva entre l'aparició dels primers fenotips cel.lulars apoptòtics i l'expressió de la proteïna Ciclina O detectada per immunohistoquímica. Aquests resultats no identifiquen clarament la Ciclina O com a inductor de l'apoptosi ni com activador de l'activitat apoptòtica de Cdk2 en el timus, però hi són totalment compatibles. Per confirmar aquesta hipòtesi inicial caldrà estudiar l'apoptosi en absència de la Ciclina O, és a dir, mitjançant l'ús d'un animal deficient per aquest gen, i a la vegada aïllar els complexos Ciclina O-Cdk2 com a responsables de l'activitat apoptòtica de Cdk2 en els animals salvatges.

Malauradament, els anticossos anti-Ciclina O generats fins al moment al laboratori són incapaços de recuperar la Ciclina O nativa d'un lisat cel.lular, fet que hauria permès establir una relació directe entre l'activitat associada a la Ciclina O i l'apoptosi.

8. Expressió de la Ciclina O en teixits adults i durant l'embriogènesi de ratolí

A més de l'expressió en el timus, també s'ha analitzat la presència del transcrit i la proteïna Ciclina O en altres teixits de ratolí. En alguns casos, l'expressió de la Ciclina O pot ser induïda per estímuls apoptòtics com la radiació gamma (ex: neurones del sistema nerviós central, cèl.lules meiótiques progenitores dels espermatozoides i enteròcits de l'intestí prim), tot i que caldrà estudiar amb profunditat si aquesta expressió és necessària o simplement coincident amb els fenòmens apoptòtics posteriors. En altres casos, l'expressió de la Ciclina O no segueix cap patró de mort cel.lular definit ja que es dona en condicions normals, sense una inducció aparent de l'apoptosi (ex: neurones del sistema nerviós central, cèl.lules epitelials i del parènquima pulmonar, cèl.lules epitelials dels ductes eferents testiculars, cèl.lules de Leydig i cossos residuals generats durant l'espermioogènesi).

Aquests resultats poden implicar aquesta nova proteïna en els processos apoptòtics induïts per radiació gamma, així com en els processos apoptòtics que es donen habitualment en el manteniment de la fisiologia de l'organisme, tanmateix no és descartable la participació de la Ciclina O en altres funcions cel.lulars. Un exemple d'aquest cas el tenim en el cervell, on s'observa una elevada quantitat de Ciclina O en condicions normals tot i que l'apoptosi no és un fenomen freqüent entre les cèl.lules del sistema nerviós adult. En aquest teixit, la Ciclina O podria tenir altres funcions diferents de l'apoptosi, tal com també s'ha proposat per p53 en les cèl.lules de Purkinje, o podria ser un romanent de la susceptibilitat apoptòtica descrita durant el desenvolupament embrionària i postembrionària del sistema nerviós central (413).

Mitjançant experiments *in vitro* hem observat que malgrat l'absència de les kinases Cdk1 i Cdk2 la proteïna recombinant GST-Ciclina O s'uneix i activa altres kinases presents en els lisats de cervell, possiblement Cdk5.

Conjuntament, aquests experiments corroboren la capacitat que té la Ciclina O per activar altres proteïnes kinasa diferents de Cdk1 i Cdk2, i actuar en funcions independents de l'apoptosi (275).

L'anàlisi de l'abundància de la proteïna Ciclina O també s'ha determinat en els estadis embrionaris de ratolí del dia 10,5 al dia 15,5 de gestació, observant un increment gradual dels nivells de la Ciclina O a mesura que avança la gestació i la diferenciació cel·lular. Durant la morfogènesi de l'organisme els processos de mort cel·lular programada són importants per la reordenació i estructuració de les cèl·lules que conformen els òrgans i teixits (76). L'expressió de la Ciclina O s'ha localitzat per immunohistoquímica principalment en alguns d'aquests processos (ex: degeneració dels condroblasts madurs en el procés d'ossificació endocondrial, generació de la cavitat cardíaca, queratinització de les cèl·lules espinoses de l'epidèrmis i formació de les fibres de cristal·lí), indicant que pot tenir una rellevància capdal en la morfogènesi dels vertebrats. Malgrat aquests indicis, caldrà generar animals deficientes per la Ciclina O per determinar la seva importància en l'embriogènesi.

9. Expressió de la Ciclina O dependent/independent de p53

Per estudiar la dependència de p53 en la inducció de la Ciclina O per irradiació hauria estat d'utilitat l'obtenció de timòcits d'animals WT i KO per p53, però com s'ha vist anteriorment, l'efecte refractari després de la inducció espontània impedeix una segona inducció del gen *ciclina O* per irradiació. Tanmateix, s'ha observat que el cultiu primari de cèl·lules MEF expressa uns nivells basals d'mRNA de la Ciclina O molt similars als observats en timus, i sorprenentment, aquests nivells s'indueixen ràpidament fins a un 1500% després del tractament amb 10Gy de radiació gamma. Així doncs, aquest ha estat un model cel·lular d'utilitat a l'hora d'estudiar la regulació de l'expressió del gen *ciclina O*. Els resultats obtinguts en cèl·lules MEF provinents d'animals WT i KO per p53, i amb el tractament amb cafeïna, mostren com la inducció del gen *ciclina O* és totalment dependent de l'activació de p53, probablement per ATM i ATR. Malgrat aquesta dependència sempre es detecta una expressió basal romanent probablement independent d'aquest factor de transcripció.

Tal com s'ha vist en diferents teixits (ex: timus, testicle, cervell, intestí prim) les lesions al DNA causades pel tractament amb radiació gamma induïxen l'expressió de la Ciclina O. En aquests teixits, la radiació gamma s'ha descrit com un agent activador de p53, iniciant la reparació o la inducció de l'apoptosi cel·lular segons la intensitat del dany genotòxic causat (27,61,222,412). En el cas dels timòcits l'activació de p53 després del tractament amb radiació gamma és indispensable per la posterior activació de Cdk2 i la inducció de l'apoptosi, però altres estímuls apoptòtics com el tractament amb glucocorticoides no requereixen l'activació de p53 per induir l'activitat apoptòtica de Cdk2 i la mort cel·lular (63,119). Aquests resultats mostren l'existència d'elements proapoptòtics dependents i independents de p53 capaços d'induir l'activitat apoptòtica de Cdk2. Curiosament, l'expressió de p53 en embrions de ratolí disminueix significativament a partir del dia 13 de gestació (191), just quan incrementa l'expressió de la Ciclina O. A la vegada, en alguns dels teixits adults irradiats (ex: intestí prim) s'ha descrit una segona onada d'apoptosi independent de p53 a temps més llargs (62), coincidint amb una segon increment de l'expressió de la Ciclina O.

Conjuntament, els resultats obtinguts a partir del cultiu de cèl·lules MEF i els observats *in vivo* no descarten la funcionalitat de la Ciclina O en fenòmens apoptòtics dependents, i alhora, independents de p53.

10. Regulació postraduccional de la Ciclina O

En la detecció de la Ciclina O per *western blotting* la proteïna es mostra sempre en forma de doblet. Mitjançant el tractament amb la fosfatasa alcalina (CIAP) s'ha observat que la banda de major tamany desapareix i adopta el mateix pes que la banda de major mobilitat. A la vegada, en presència d'inhibidors de fosfatases el tractament de la fosfatasa alcalina no té cap efecte sobre la Ciclina O, i es manté la formació del doblet. Aquests resultats confirmen que la Ciclina O pot ser modificada postraduccionalment per fosforilació, un fenomen que ja s'havia detectat anteriorment en els assajos d'activitat kinasa dels complexos formats per la Ciclina O. En aquests assajos no només es fosforila el substrat afegit en el moment de la reacció, la Histona H1, sinó que permanentment apareix una banda fosforilada corresponent a la Ciclina O, suggerint que els complexos cdk-Ciclina O fosforilen la pròpia ciclina, fenomen conegut com autofosforilació.

Malgrat aquesta modificació postraduccional, l'activitat dels complexos formats per la Ciclina O prèviament tractada amb CIAP es manté igual que en l'estat fosforilat, indicant que la fosforilació de la Ciclina O no afecta a la formació i a l'activitat dels complexos cdk-Ciclina O sobre la Histona H1 ni sobre la pròpia Ciclina O. Així doncs, la fosforilació de la Ciclina O podria tenir altres funcions, com per exemple, regular la distribució nuclear i citoplasmàtica de la ciclina durant el cicle cel·lular i/o la seva degradació *in vivo*.

Malgrat el fenomen d'autofosforilació, descrit també en altres complexos cdk-ciclina (411), no es pot descartar l'acció d'altres proteïnes kinasa, com GSK3 β , sobre la Ciclina O. L'estabilitat d'altres membres de la família ciclina, com la Ciclina D1 i la Ciclina E, està regulada per la prèvia fosforilació de la kinasa GSK3 β (82,402). Per comprovar aquesta possibilitat sobre la Ciclina O s'ha demostrat que la proteïna recombinant GST-Ciclina O també pot ser fosforilada *in vitro* per la kinasa GSK3 β . A la vegada, el tractament amb l'inhibidor d'aquesta kinasa, LiCl, inhibeix la degradació de la Ciclina O d'un cultiu cel·lular de la mateixa manera que el tractament amb l'inhibidor del proteasoma, Cbz-LLnL. Juntament, aquests resultats suggereixen que la degradació de la Ciclina O pot estar mediada pel proteasoma a través d'una senyalització prèvia per la fosforilació de la GSK3 β .

Mitjançant experiments de sincronització cel·lular, o selecció per sortint, s'ha observat que els nivells totals de la proteïna Ciclina O i el seu estat de fosforilació depenen de cada fase del cicle cel·lular. Mentre que a partir de la fase G1 fins a la fase S incrementen els nivells totals i la forma fosforilada de la ciclina, a la fase G2/M s'observa un gran acúmul de la proteïna no fosforilada, indicant que l'inici del següent cicle, o la transició de G2/M a la fase G1, impliquen necessàriament la degradació de la Ciclina O per recuperar els nivells observats a la fase G1. Possiblement, la forma fosforilada és poli-ubiquitinada i degradada pel proteasoma, tal com s'ha descrit en el cas de la la Ciclina D1 i la Ciclina E (82,402). Així doncs, la Ciclina O sembla tenir el comportament cíclic característic dels membres de la família ciclina que intervenen en el control del cicle cel·lular (92), i a la vegada, segueix sent el millor candidat per activar la kinasa Cdk2 en apoptosi.

VI. CONCLUSIONS

1-El locus 5p15.2-p13.1 humà codifica per un nou gen anomenat *ciclina O* identificat també en altres espècies de vertebrats i amb homologia amb altres membres de la família de les ciclins implicades en la regulació del cicle cel.lular.

2-La proteïna Ciclina O és capaç d'interaccionar i activar la proteïna Cdk2, i possiblement altres kinases, generant una activitat kinasa inhibible amb roscovitina i capaç de fosforilar la Histona H1 i la pròpia Ciclina O per un mecanisme d'autofosforilació.

3-La proteïna Ciclina O conté una seqüència NLS i pot ser detectada al compartiment nuclear i al compartiment citoplasmàtic simultàniament.

4-L'expressió transitòria de la Ciclina O en cèl.lules HEK293 provoca un increment de l'apoptosi.

5-L'expressió constitutiva de la Ciclina O comporta un retard en la sortida de la fase S i una inhibició de la taxa de creixement cel.lular.

6-L'expressió constitutiva de la Ciclina O en clons induïbles inhibeix la inducció de l'apoptosi després del tractament amb diferents insults cel.lulars, malgrat la inducció de la proteïna proapoptòtica Bax.

7-L'expressió constitutiva de la Ciclina O en clons induïbles inhibeix la sortida del *checkpoint* de G2 induït per radiació gamma, possiblement a través de l'activació de p53 i l'expressió de p21^{Cip1}.

8-La radiació gamma indueix una ràpida i curta inducció del gen de la Ciclina O en cèl.lules MEF de manera dependent de p53 i les kinases ATM/ATR, i de manera independent de la síntesi *de novo* de proteïnes.

9-La Ciclina O pot ser fosforilada pels complexos Cdk2-Ciclina O i per la kinasa GSK3 β sense alterar la seva activitat kinasa associada.

10-La fosforilació de la Ciclina O per la kinasa GSK3 β pot induir la seva degradació proteosomal amb un temps de vida mitjana d'aproximadament 5h.

11-La proteïna Ciclina O i la seva activitat kinasa associada tenen un comportament cíclic incrementant des de la fase G1 fins a les fases G2 del cicle cel.lular i degradant-se a la fase M.

12-L'expressió total de la Ciclina O incrementa durant el desenvolupament de ratolí (E10,5-E15,5), i es dona principalment en tipus cel.lulars destinats a patir la mort cel.lular programada (ex: condrocits i cèl.lules basals de l'epidermis).

13-L'expressió del gen de la Ciclina O en ratolins adults es dona principalment al testicle, al cervell i al pulmó, tot i que pot existir a nivells baixos d'expressió en altres teixits, com al timus.

14-Al testicle la Ciclina O és detectada al citoplasma de les cèl.lules epitelials dels ductes eferents, a l'espai intersticial dels tubs seminífers (cèl.lules de Leydig), i als

citoplasmes residuals del procés d'espermatogènesi prèvia la fagocitosi per les cèl.lules de Sertoli.

15-La radiació gamma provoca un increment de la Ciclina O en cèl.lules progenitores dels espermatozoides, probablement coincidint amb un increment de l'apoptosi dependent o independent de p53.

16-Al cervell i cerebel hi ha una expressió generalitzada de la Ciclina O en condicions normals sense una funcionalitat proapoptòtica aparent.

17-La radiació gamma indueix un increment de l'expressió de la Ciclina O al sistema nerviós central, especialment a les cèl.lules de Purkinje i a la capa granular del Gir Dentat de l'Hipocamp, sense una funcionalitat proapoptòtica aparent.

18-A les cèl.lules de l'epiteli bronquial i el parènquima pulmonar la Ciclina O s'expressa sense una funció proapoptòtica aparent.

19-La Ciclina O és detectada a les cèl.lules basals de les criptes intestinals susceptibles a patir l'apoptosi que permet l'equilibri funcional de l'epiteli intestinal.

20-La radiació gamma indueix un increment de la Ciclina O a les cèl.lules basals i en direcció a la llum intestinal prèvia la inducció de l'apoptosi dependent i independent de p53.

21-La radiació gamma indueix una ràpida i curta inducció de la Ciclina O al timus, precedint un increment de l'apoptosi cel.lular i posicionant la Ciclina O com a potencial activador de Cdk2 en l'apoptosi de timòcits.

22-La disgregació del timus en cèl.lules úniques provoca una inducció immediata de l'expressió del gen de la Ciclina O que precedeix a la mort cel.lular espontània del cultiu de timòcits.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Adachi, S., H. Ito, M. Tamamori-Adachi, Y. Ono, T. Nozato, S. Abe, M. Ikeda, F. Marumo, and M. Hiroe. 2001. Cyclin A/cdk2 activation is involved in hypoxia-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Circ.Res.* 88:408-414.
2. Agarwal, M. L., A. Agarwal, W. R. Taylor, and G. R. Stark. 1995. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92:8493-8497.
3. Ajchenbaum, F., K. Ando, J. A. DeCaprio, and J. D. Griffin. 1993. Independent regulation of human D-type cyclin gene expression during G1 phase in primary human T lymphocytes. *J.Biol.Chem.* 268:4113-4119.
4. Alam, S. M., P. J. Travers, J. L. Wung, W. Nasholds, S. Redpath, S. C. Jameson, and N. R. Gascoigne. 1996. T-cell-receptor affinity and thymocyte positive selection. *Nature* 381:616-620.
5. Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molecular Biology of the Cell* (4th Edition). 2002. Ref Type: Generic
6. Albrechtsen, N., I. Dornreiter, F. Grosse, E. Kim, L. Wiesmuller, and W. Deppert. 1999. Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53. *Oncogene* 18:7706-7717.
7. Allan, L. A., N. Morrice, S. Brady, G. Magee, S. Pathak, and P. R. Clarke. 2003. Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nat.Cell Biol.* 5:647-654.
8. Almon, E., N. Goldfinger, A. Kapon, D. Schwartz, A. J. Levine, and V. Rotter. 1993. Testicular tissue-specific expression of the p53 suppressor gene. *Dev.Biol.* 156:107-116.
9. Alt, J. R., J. L. Cleveland, M. Hannink, and J. A. Diehl. 2000. Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation. *Genes Dev.* 14:3102-3114.
10. Altman, J. 1972. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. I. The external germinal layer and the transitional molecular layer. *J.Comp Neurol.* 145:353-397.
11. Altman, J. and W. J. Anderson. 1972. Experimental reorganization of the cerebellar cortex. I. Morphological effects of elimination of all microneurons with prolonged x-irradiation started at birth. *J.Comp Neurol.* 146:355-406.
12. Anderson, M., S. K. Anderson, and A. G. Farr. 2000. Thymic vasculature: organizer of the medullary epithelial compartment? *Int.Immunol.* 12:1105-1110.
13. Antonini, J. M., R. W. Clarke, G. G. Krishna Murthy, P. Sreekanthan, N. Jenkins, T. W. Eagar, and J. D. Brain. 1998. Freshly generated stainless steel welding fume induces greater lung inflammation in rats as compared to aged fume. *Toxicol.Lett.* 98:77-86.
14. Antonini, J. M., G. G. Krishna Murthy, and J. D. Brain. 1997. Responses to welding fumes: lung injury, inflammation, and the release of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta. *Exp.Lung Res.* 23:205-227.
15. Antonini, J. M., N. J. Lawryk, G. G. Murthy, and J. D. Brain. 1999. Effect of welding fume solubility on lung macrophage viability and function in vitro. *J.Toxicol.EnvIRON.Health A* 58:343-363.
16. Antonini, J. M., S. S. Leonard, J. R. Roberts, C. Solano-Lopez, S. H. Young, X. Shi, and M. D. Taylor. 2005. Effect of stainless steel manual metal arc welding fume on free radical production, DNA damage, and apoptosis induction. *Mol.Cell Biochem.* 279:17-23.

17. Armstrong, J. F., M. H. Kaufman, D. J. Harrison, and A. R. Clarke. 1995. High-frequency developmental abnormalities in p53-deficient mice. *Curr.Biol.* 5:931-936.
18. Ashley, T., D. Walpita, and D. G. de Rooij. 2001. Localization of two mammalian cyclin dependent kinases during mammalian meiosis. *J.Cell Sci.* 114:685-693.
19. Avantaggiati, M. L., V. Ogryzko, K. Gardner, A. Giordano, A. S. Levine, and K. Kelly. 1997. Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell* 89:1175-1184.
20. Ayad, N. G., S. Rankin, M. Murakami, J. Jebanathirajah, S. Gygi, and M. W. Kirschner. 2003. Tome-1, a trigger of mitotic entry, is degraded during G1 via the APC. *Cell* 113:101-113.
21. Bakheet, T., M. Frevel, B. R. Williams, W. Greer, and K. S. Khabar. 2001. ARED: human AU-rich element-containing mRNA database reveals an unexpectedly diverse functional repertoire of encoded proteins. *Nucleic Acids Res.* 29:246-254.
22. Baldin, V., J. Lukas, M. J. Marcote, M. Pagano, and G. Draetta. 1993. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev.* 7:812-821.
23. Banin, S., L. Moyal, S. Shieh, Y. Taya, C. W. Anderson, L. Chessa, N. I. Smorodinsky, C. Prives, Y. Reiss, Y. Shiloh, and Y. Ziv. 1998. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 281:1674-1677.
24. Beals, C. R., C. M. Sheridan, C. W. Turck, P. Gardner, and G. R. Crabtree. - Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3.-4.
25. Beroud, C. and T. Soussi. 2003. The UMD-p53 database: new mutations and analysis tools. *Hum.Mutat.* 21:176-181.
26. Berthet, C., E. Aleem, V. Coppola, L. Tessarollo, and P. Kaldis. 2003. Cdk2 knockout mice are viable. *Curr.Biol.* 13:1775-1785.
27. Beumer, T. L., H. L. Roepers-Gajadien, I. S. Gademan, P. P. van Buul, G. Gil-Gomez, D. H. Rutgers, and D. G. de Rooij. 1998. The role of the tumor suppressor p53 in spermatogenesis. *Cell Death.Differ.* 5:669-677.
28. Beumer, T. L., H. L. Roepers-Gajadien, L. S. Gademan, D. H. Rutgers, and D. G. de Rooij. 1997. P21(Cip1/WAF1) expression in the mouse testis before and after X irradiation. *Mol.Reprod.Dev.* 47:240-247.
29. Biju, M. P., A. K. Neumann, S. J. Bensinger, R. S. Johnson, L. A. Turka, and V. H. Haase. - Vhlh gene deletion induces Hif-1-mediated cell death in thymocytes.-47.
30. Bischoff, J. R., P. N. Friedman, D. R. Marshak, C. Prives, and D. Beach. 1990. Human p53 is phosphorylated by p60-cdc2 and cyclin B-cdc2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87:4766-4770.
31. Blasina, A., B. D. Price, G. A. Turenne, and C. H. McGowan. 1999. Caffeine inhibits the checkpoint kinase ATM. *Curr.Biol.* 9:1135-1138.
32. Blattner, C., T. Hay, D. W. Meek, and D. P. Lane. 2002. Hypophosphorylation of Mdm2 augments p53 stability. *Mol.Cell Biol.* 22:6170-6182.
33. Blydes, J. P., M. G. Luciani, S. Pospisilova, H. M. Ball, B. Vojtesek, and T. R. Hupp. 2001. Stoichiometric phosphorylation of human p53 at Ser315 stimulates p53-dependent transcription. *J.Biol.Chem.* 276:4699-4708.
34. Bond, J. A., K. Webley, F. S. Wyllie, C. J. Jones, A. Craig, T. Hupp, and D. Wynford-Thomas. 1999. p53-Dependent growth arrest and altered p53-immunoreactivity following

- metabolic labelling with ^{32}P ortho-phosphate in human fibroblasts. *Oncogene* 18:3788-3792.
35. Bonni, A., A. Brunet, A. E. West, S. R. Datta, M. A. Takasu, and M. E. Greenberg. 1999. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286:1358-1362.
 36. Bouillet, P., J. F. Purton, D. I. Godfrey, L. C. Zhang, L. Coultas, H. Puthalakath, M. Pellegrini, S. Cory, J. M. Adams, and A. Strasser. 2002. BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* 415:922-926.
 37. Boyd, R. L., C. L. Tucek, D. I. Godfrey, D. J. Izon, T. J. Wilson, N. J. Davidson, A. G. Bean, H. M. Ladyman, M. A. Ritter, and P. Hugo. 1993. The thymic microenvironment. *Immunol.Today* 14:445-459.
 38. Brugarolas, J., C. Chandrasekaran, J. I. Gordon, D. Beach, T. Jacks, and G. J. Hannon. 1995. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 377:552-557.
 39. Caelles, C., A. Helmberg, and M. Karin. 1994. p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* 370:220-223.
 40. Calnan, B. J., S. Szychowski, F. K. Chan, D. Cado, and A. Winoto. 1995. A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection. *Immunity*. 3:273-282.
 41. Calvo, W., J. W. Hopewell, H. S. Reinhold, and T. K. Yeung. 1988. Time- and dose-related changes in the white matter of the rat brain after single doses of X rays. *Br.J.Radiol.* 61:1043-1052.
 42. Cameron, H. A. and R. McKay. 1998. Stem cells and neurogenesis in the adult brain. *Curr.Opin.Neurobiol.* 8:677-680.
 43. Cameron, H. A., P. Tanapat, and E. Gould. 1998. Adrenal steroids and N-methyl-D-aspartate receptor activation regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats through a common pathway. *Neuroscience* 82:349-354.
 44. Casanovas, O., M. Jaumot, A. B. Paules, N. Agell, and O. Bachs. 2004. P38SAPK2 phosphorylates cyclin D3 at Thr-283 and targets it for proteasomal degradation. *Oncogene* 23:7537-7544.
 45. Casanovas, O., F. Miro, J. M. Estanyol, E. Itarte, N. Agell, and O. Bachs. 2000. Osmotic stress regulates the stability of cyclin D1 in a p38SAPK2-dependent manner. *J.Biol.Chem.* 275:35091-35097.
 46. Chan, T. A., H. Hermeking, C. Lengauer, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1999. 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* 401:616-620.
 47. Chang, L. and M. Karin. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410:37-40.
 48. Chaturvedi, P., W. K. Eng, Y. Zhu, M. R. Mattern, R. Mishra, M. R. Hurle, X. Zhang, R. S. Annan, Q. Lu, L. F. Faucette, G. F. Scott, X. Li, S. A. Carr, R. K. Johnson, J. D. Winkler, and B. B. Zhou. 1999. Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway. *Oncogene* 18:4047-4054.
 49. Chau, V., J. W. Tobias, A. Bachmair, D. Marriott, D. J. Ecker, D. K. Gonda, and A. Varshavsky. 1989. A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 243:1576-1583.

50. Chehab, N. H., A. Malikzay, M. Appel, and T. D. Halazonetis. 2000. Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev.* 14:278-288.
51. Chen, C. Y., R. Gherzi, S. E. Ong, E. L. Chan, R. Raijmakers, G. J. Pruijn, G. Stoecklin, C. Moroni, M. Mann, and M. Karin. 2001. AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* 107:451-464.
52. Chen, C. Y. and A. B. Shyu. 1995. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem.Sci.* 20:465-470.
53. Chen, G. and E. Y. H. P. Lee. 1996. The product of the ATM gene is a 370-kDa nuclear phosphoprotein. *J.Biol.Chem.* 271:33693-33697.
54. Chen, H. H., Y. C. Wang, and M. J. Fann. 2006. Identification and characterization of the CDK12/cyclin L1 complex involved in alternative splicing regulation. *Mol.Cell Biol.* 26:2736-2745.
55. Chen, J., S. Larochelle, X. Li, and B. Suter. 2003. Xpd/Ercc2 regulates CAK activity and mitotic progression. *Nature* 424:228-232.
56. Chen, X. 2002. Cyclin G: a regulator of the p53-Mdm2 network. *Dev.Cell* 2:518-519.
57. Chen, X., L. J. Ko, L. Jayaraman, and C. Prives. 1996. p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev.* 10:2438-2451.
58. Cheng, L. E., F. K. Chan, D. Cado, and A. Winoto. 1997. Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *EMBO J.* 16:1865-1875.
59. Cheng, M., V. Sexl, C. J. Sherr, and M. F. Roussel. 1998. Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95:1091-1096.
60. Cho, Y., S. Gorina, P. D. Jeffrey, and N. P. Pavletich. 1994. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 265:346-355.
61. Clarke, A. R., S. Gledhill, M. L. Hooper, C. C. Bird, and A. H. Wyllie. 1994. p53 dependence of early apoptotic and proliferative responses within the mouse intestinal epithelium following gamma-irradiation. *Oncogene* 9:1767-1773.
62. Clarke, A. R., L. A. Howard, D. J. Harrison, and D. J. Winton. 1997. p53, mutation frequency and apoptosis in the murine small intestine. *Oncogene* 14:2015-2018.
63. Clarke, A. R., C. A. Purdie, D. J. Harrison, R. G. Morris, C. C. Bird, M. L. Hooper, and A. H. Wyllie. 1993. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 362:849-852.
64. Clement, A., A. Henrion-Caude, V. Besnard, and S. Corroyer. 2001. Role of cyclins in epithelial response to oxidants. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 164:S81-S84.
65. Cliby, W. A., C. J. Roberts, K. A. Cimprich, C. M. Stringer, J. R. Lamb, S. L. Schreiber, and S. H. Friend. 1998. Overexpression of a kinase-inactive ATR protein causes sensitivity to DNA-damaging agents and defects in cell cycle checkpoints. *EMBO J.* 17:159-169.
66. Clifford, B., M. Beljin, G. R. Stark, and W. R. Taylor. 2003. G2 arrest in response to topoisomerase II inhibitors: the role of p53. *Cancer Res.* 63:4074-4081.

67. Clore, G. M., J. Ernst, R. Clubb, J. G. Omichinski, W. M. Kennedy, K. Sakaguchi, E. Appella, and A. M. Gronenborn. 1995. Refined solution structure of the oligomerization domain of the tumour suppressor p53. *Nat.Struct.Biol.* 2:321-333.
68. Clurman, B. E., R. J. Sheaff, K. Thress, M. Groudine, and J. M. Roberts. 1996. Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation. *Genes Dev.* 10:1979-1990.
69. Cobrinik, D. 2005. Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* 24:2796-2809.
70. Compton, M. M. and J. A. Cidlowski. 1986. Rapid in vivo effects of glucocorticoids on the integrity of rat lymphocyte genomic deoxyribonucleic acid. *Endocrinology* 118:38-45.
71. Contreras, A., T. K. Hale, D. L. Stenoien, J. M. Rosen, M. A. Mancini, and R. E. Herrera. 2003. The dynamic mobility of histone H1 is regulated by cyclin/CDK phosphorylation. *Mol.Cell Biol.* 23:8626-8636.
72. Corroyer, S., B. Maitre, V. Cazals, and A. Clement. 1996. Altered regulation of G1 cyclins in oxidant-induced growth arrest of lung alveolar epithelial cells. Accumulation of inactive cyclin E-DCK2 complexes. *J.Biol.Chem.* 271:25117-25125.
73. Craig, A. L., L. Burch, B. Vojtesek, J. Mikutowska, A. Thompson, and T. R. Hupp. 1999. Novel phosphorylation sites of human tumour suppressor protein p53 at Ser20 and Thr18 that disrupt the binding of mdm2 (mouse double minute 2) protein are modified in human cancers. *Biochem.J.* 342 (Pt 1):133-141.
74. Cross, D. A., D. R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich, and B. A. Hemmings. 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378:785-789.
75. Cross, S. M., C. A. Sanchez, C. A. Morgan, M. K. Schimke, S. Ramel, R. L. Idzerda, W. H. Raskind, and B. J. Reid. 1995. A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science* 267:1353-1356.
76. Danial, N. N. and S. J. Korsmeyer. 2004. Cell death: critical control points. *Cell* 116:205-219.
77. De Bondt, H. L., J. Rosenblatt, J. Jancarik, H. D. Jones, D. O. Morgan, and S. H. Kim. 1993. Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature* 363:595-602.
78. de Rozières, S., R. Maya, M. Oren, and G. Lozano. 2000. The loss of mdm2 induces p53-mediated apoptosis. *Oncogene* 19:1691-1697.
79. Del Sal, G., M. Murphy, E. Ruaro, D. Lazarevic, A. J. Levine, and C. Schneider. 1996. Cyclin D1 and p21/waf1 are both involved in p53 growth suppression. *Oncogene* 12:177-185.
80. Deshaies, R. J., V. Chau, and M. Kirschner. 1995. Ubiquitination of the G1 cyclin Cln2p by a Cdc34p-dependent pathway. *EMBO J.* 14:303-312.
81. Dickson, D. W. 2001. Neuropathology of Alzheimer's disease and other dementias. *Clin.Geriatr.Med.* 17:209-228.
82. Diehl, J. A., M. Cheng, M. F. Roussel, and C. J. Sherr. 1998. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* 12:3499-3511.
83. Diehl, J. A. and C. J. Sherr. 1997. A dominant-negative cyclin D1 mutant prevents nuclear import of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and its phosphorylation by CDK-activating kinase. *Mol.Cell Biol.* 17:7362-7374.

84. Diehl, J. A., F. Zindy, and C. J. Sherr. 1997. Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 11:957-972.
85. Donehower, L. A., M. Harvey, B. L. Slagle, M. J. McArthur, C. A. Montgomery, Jr., J. S. Butel, and A. Bradley. 1992. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356:215-221.
86. Doucey, M. A., L. Goffin, D. Naeher, O. Michielin, P. Baumgartner, P. Guillaume, E. Palmer, and I. F. Luescher. 2003. CD3 delta establishes a functional link between the T cell receptor and CD8. *J.Biol.Chem.* 278:3257-3264.
87. Ducruet, A. P. and J. S. Lazo. 2003. Regulation of Cdc25A half-life in interphase by cyclin-dependent kinase 2 activity. *J.Biol.Chem.* 278:31838-31842.
88. Dudek, H., S. R. Datta, T. F. Franke, M. J. Birnbaum, R. Yao, G. M. Cooper, R. A. Segal, D. R. Kaplan, and M. E. Greenberg. 1997. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275:661-665.
89. Dumont, P., J. I. Leu, P. A. Della, III, D. L. George, and M. Murphy. 2003. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat.Genet.* 33:357-365.
90. Eastman, A. 2004. Cell cycle checkpoints and their impact on anticancer therapeutic strategies. *J.Cell Biochem.* 91:223-231.
91. El Deiry, W. S. 1998. Regulation of p53 downstream genes. *Semin.Cancer Biol.* 8:345-357.
92. Evans, T., E. T. Rosenthal, J. Youngblom, D. Distel, and T. Hunt. - Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division.- 96.
93. Falck, J., J. Coates, and S. P. Jackson. 2005. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* 434:605-611.
94. Fang, S., J. P. Jensen, R. L. Ludwig, K. H. Vousden, and A. M. Weissman. 2000. Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J.Biol.Chem.* 275:8945-8951.
95. Fehling, H. J., A. Krotkova, C. Saint-Ruf, and H. von Boehmer. 1995. Crucial role of the pre-T-cell receptor alpha gene in development of alpha beta but not gamma delta T cells. *Nature* 375:795-798.
96. Fei, P., E. J. Bernhard, and W. S. El Deiry. 2002. Tissue-specific induction of p53 targets in vivo. *Cancer Res.* 62:7316-7327.
97. Feldman, R. M., C. C. Correll, K. B. Kaplan, and R. J. Deshaies. 1997. A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell* 91:221-230.
98. Feng, R., C. Rampon, Y. P. Tang, D. Shrom, J. Jin, M. Kyin, B. Sopher, M. W. Miller, C. B. Ware, G. M. Martin, S. H. Kim, R. B. Langdon, S. S. Sisodia, and J. Z. Tsien. 2001. Deficient neurogenesis in forebrain-specific presenilin-1 knockout mice is associated with reduced clearance of hippocampal memory traces. *Neuron* 32:911-926.
99. Ferrer, I., T. Serrano, S. Alcantara, A. Tortosa, and F. Graus. 1993. X-ray-induced cell death in the developing hippocampal complex involves neurons and requires protein synthesis. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 52:370-378.

100. Fiol, C. J., A. M. Mahrenholz, Y. Wang, R. W. Roeske, and P. J. Roach. 1987. Formation of protein kinase recognition sites by covalent modification of the substrate. Molecular mechanism for the synergistic action of casein kinase II and glycogen synthase kinase 3. *J.Biol.Chem.* 262:14042-14048.
101. Fiorini, E., I. Schmitz, W. E. Marissen, S. L. Osborn, M. Touma, T. Sasada, P. A. Reche, E. V. Tibaldi, R. E. Hussey, A. M. Kruisbeek, E. L. Reinherz, and L. K. Clayton. 2002. Peptide-induced negative selection of thymocytes activates transcription of an NF-kappa B inhibitor. *Mol.Cell* 9:637-648.
102. Fischer, J. A., S. Muller-Weeks, and S. Caradonna. 2004. Proteolytic degradation of the nuclear isoform of uracil-DNA glycosylase occurs during the S phase of the cell cycle. *DNA Repair (Amst)* 3:505-513.
103. Forrest, A. R., D. Taylor, and S. Grimmond. 2003. Exploration of the cell-cycle genes found within the RIKEN FANTOM2 data set. *Genome Res.* 13:1366-1375.
104. Fox, C. A., M. D. Sheets, and M. P. Wickens. 1989. Poly(A) addition during maturation of frog oocytes: distinct nuclear and cytoplasmic activities and regulation by the sequence UUUUUAU. *Genes Dev.* 3:2151-2162.
105. Frame, S. and P. Cohen. 2001. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem.J.* 359:1-16.
106. Franke, T. F., D. R. Kaplan, L. C. Cantley, and A. Toker. 1997. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 275:665-668.
107. Freedman, D. A., L. Wu, and A. J. Levine. 1999. Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell Mol.Life Sci.* 55:96-107.
108. Frenkel, J., D. Sherman, A. Fein, D. Schwartz, N. Almog, A. Kapon, N. Goldfinger, and V. Rotter. 1999. Accentuated apoptosis in normally developing p53 knockout mouse embryos following genotoxic stress. *Oncogene* 18:2901-2907.
109. Fridman, J. S. and S. W. Lowe. 2003. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 22:9030-9040.
110. Friedberg, E. C., A. J. Bardwell, L. Bardwell, W. J. Feaver, R. D. Kornberg, J. Q. Svejstrup, A. E. Tomkinson, and Z. Wang. 1995. Nucleotide excision repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: its relationship to specialized mitotic recombination and RNA polymerase II basal transcription. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 347:63-68.
111. Furnari, B., N. Rhind, and P. Russell. 1997. Cdc25 mitotic inducer targeted by chk1 DNA damage checkpoint kinase. *Science* 277:1495-1497.
112. Gage, F. H., G. Kempermann, T. D. Palmer, D. A. Peterson, and J. Ray. 1998. Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. *J.Neurobiol.* 36:249-266.
113. Gebauer, F. and J. D. Richter. 1995. Cloning and characterization of a *Xenopus* poly(A) polymerase. *Mol.Cell Biol.* 15:1422-1430.
114. Gebauer, F. and J. D. Richter. 1996. Mouse cytoplasmic polyadenylation element binding protein: an evolutionarily conserved protein that interacts with the cytoplasmic polyadenylation elements of c-mos mRNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:14602-14607.
115. Germeraad, W. T., H. Kawamoto, M. Itoi, Y. Jiang, T. Amagai, Y. Katsura, and W. van Ewijk. 2003. Development of thymic microenvironments in vitro is oxygen-dependent and requires permanent presence of T-cell progenitors. *J.Histochem.Cytochem.* 51:1225-1235.

116. Ghosh, M., K. Huang, and S. J. Berberich. 2003. Overexpression of Mdm2 and MdmX fusion proteins alters p53 mediated transactivation, ubiquitination, and degradation. *Biochemistry* 42:2291-2299.
117. Giaccia, A. J. and M. B. Kastan. 1998. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev.* 12:2973-2983.
118. Giannakakou, P., D. L. Sackett, Y. Ward, K. R. Webster, M. V. Blagosklonny, and T. Fojo. 2000. p53 is associated with cellular microtubules and is transported to the nucleus by dynein. *Nat.Cell Biol.* 2:709-717.
119. Gil-Gomez, G., A. Berns, and H. J. Brady. 1998. A link between cell cycle and cell death: Bax and Bcl-2 modulate Cdk2 activation during thymocyte apoptosis. *EMBO J.* 17:7209-7218.
120. Gingras, A. C., B. Raught, and N. Sonenberg. - eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation.-*Annu.*
121. Glotzer, M., A. W. Murray, and M. W. Kirschner. 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349:132-138.
122. Goetz, A. W., H. van der Kuip, R. Maya, M. Oren, and W. E. Aulitzky. 2001. Requirement for Mdm2 in the survival effects of Bcr-Abl and interleukin 3 in hematopoietic cells. *Cancer Research* 61:7635-7641.
123. Golsteyn, R. M. 2005. Cdk1 and Cdk2 complexes (cyclin dependent kinases) in apoptosis: a role beyond the cell cycle. *Cancer Lett.* 217:129-138.
124. Gossen, M. and H. Bujard. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:5547-5551.
125. Gottlieb, E., R. Haffner, A. King, G. Asher, P. Gruss, P. Lonai, and M. Oren. 1997. Transgenic mouse model for studying the transcriptional activity of the p53 protein: age- and tissue-dependent changes in radiation-induced activation during embryogenesis. *EMBO J.* 16:1381-1390.
126. Granes, F., M. B. Roig, H. J. Brady, and G. Gil-Gomez. 2004. Cdk2 activation acts upstream of the mitochondrion during glucocorticoid induced thymocyte apoptosis. *Eur.J.Immunol.* 34:2781-2790.
127. Gu, J., H. Kawai, L. Nie, H. Kitao, D. Wiederschain, A. G. Jochemsen, J. Parant, G. Lozano, and Z. M. Yuan. 2002. Mutual dependence of MDM2 and MDMX in their functional inactivation of p53. *J.Biol.Chem.* 277:19251-19254.
128. Gu, W. and R. G. Roeder. 1997. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90:595-606.
129. Gueydan, C., L. Houzet, A. Marchant, A. Sels, G. Huez, and V. Kruys. 1996. Engagement of tumor necrosis factor mRNA by an endotoxin-inducible cytoplasmic protein. *Mol.Med.* 2:479-488.
130. Guillouf, C., F. Rosselli, K. Krishnaraju, E. Moustacchi, B. Hoffman, and D. A. Liebermann. 1995. p53 involvement in control of G2 exit of the cell cycle: role in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* 10:2263-2270.
131. Hake, L. E. and J. D. Richter. 1994. CPEB is a specificity factor that mediates cytoplasmic polyadenylation during *Xenopus* oocyte maturation. *Cell* 79:617-627.
132. Hakem, A., T. Sasaki, I. Kozieradzki, and J. M. Penninger. 1999. The cyclin-dependent kinase Cdk2 regulates thymocyte apoptosis. *J.Exp.Med.* 189:957-968.

133. Hare, K. J., E. J. Jenkinson, and G. Anderson. 1999. In vitro models of T cell development. *Semin.Immunol.* 11:3-12.
134. Harper, J. W., S. J. Elledge, K. Keyomarsi, B. Dynlacht, L. H. Tsai, P. Zhang, S. Dobrowolski, C. Bai, L. Connell-Crowley, E. Swindell, and . 1995. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol.Biol.Cell* 6:387-400.
135. Haug, T., F. Skorpen, P. A. Aas, V. Malm, C. Skjelbred, and H. E. Krokan. 1998. Regulation of expression of nuclear and mitochondrial forms of human uracil-DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res.* 26:1449-1457.
136. Haupt, Y., R. Maya, A. Kazaz, and M. Oren. 1997. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387:296-299.
137. Haushalter, K. A., M. W. Todd Stukenberg, M. W. Kirschner, and G. L. Verdine. 1999. Identification of a new uracil-DNA glycosylase family by expression cloning using synthetic inhibitors. *Curr.Biol.* 9:174-185.
138. Hayes, S. M. and P. E. Love. 2002. Distinct structure and signaling potential of the gamma delta TCR complex. *Immunity.* 16:827-838.
139. Hazel, T. G., D. Nathans, and L. F. Lau. 1988. A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85:8444-8448.
140. Hershko, A. and A. Ciechanover. 1992. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu.Rev.Biochem.* 61:761-807.
141. Hershko, A., H. Heller, S. Elias, and A. Ciechanover. 1983. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J.Biol.Chem.* 258:8206-8214.
142. Herzog, K. H., M. J. Chong, M. Kapsetaki, J. I. Morgan, and P. J. McKinnon. 1998. Requirement for Atm in ionizing radiation-induced cell death in the developing central nervous system. *Science* 280:1089-1091.
143. Hirao, A., Y. Y. Kong, S. Matsuoka, A. Wakeham, J. Ruland, H. Yoshida, D. Liu, S. J. Elledge, and T. W. Mak. 2000. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* 287:1824-1827.
144. Hirao, A., Y. Y. Kong, S. Matsuoka, A. Wakeham, J. Ruland, H. Yoshida, D. Liu, S. J. Elledge, and T. W. Mak. 2000. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* 287:1824-1827.
145. Hirose, J., T. Kouro, H. Igarashi, T. Yokota, N. Sakaguchi, and P. W. Kincade. 2002. A developing picture of lymphopoiesis in bone marrow. *Immunol.Rev.* 189:28-40.
146. Hochstrasser, M. 1995. Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr.Opin.Cell Biol.* 7:215-223.
147. Hoffman, W. H., S. Biade, J. T. Zilfou, J. Chen, and M. Murphy. 2002. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J.Biol.Chem.* 277:3247-3257.
148. Hollander, G. A., B. Wang, A. Nichogiannopoulou, P. P. Platenburg, W. van Ewijk, S. J. Burakoff, J. C. Gutierrez-Ramos, and C. Terhorst. 1995. Developmental control point in induction of thymic cortex regulated by a subpopulation of prothymocytes. *Nature* 373:350-353.

149. Hollstein, M., K. Rice, M. S. Greenblatt, T. Soussi, R. Fuchs, T. Sorlie, E. Hovig, B. Smith-Sorensen, R. Montesano, and C. C. Harris. 1994. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.* 22:3551-3555.
150. Honda, R., H. Tanaka, and H. Yasuda. 1997. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.* 420:25-27.
151. Hsieh, J. K., F. S. Chan, D. J. O'Connor, S. Mittnacht, S. Zhong, and X. Lu. 1999. RB regulates the stability and the apoptotic function of p53 via MDM2. *Mol.Cell* 3:181-193.
152. Huckins, C. 1978. Spermatogonial intercellular bridges in whole-mounted seminiferous tubules from normal and irradiated rodent testes. *Am.J.Anat.* 153:97-121.
153. Hupp, T. R. and D. P. Lane. 1995. Two distinct signaling pathways activate the latent DNA binding function of p53 in a casein kinase II-independent manner. *J.Biol.Chem.* 270:18165-18174.
154. Hupp, T. R., D. P. Lane, and K. L. Ball. 2000. Strategies for manipulating the p53 pathway in the treatment of human cancer. *Biochem.J.* 352 Pt 1:1-17.
155. Hussain, S. P. and C. C. Harris. 1998. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res.* 58:4023-4037.
156. Hwang, B. J., J. M. Ford, P. C. Hanawalt, and G. Chu. 1999. Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:424-428.
157. Inouye, M. and Y. Kameyama. 1983. Cell death in the developing rat cerebellum following X-irradiation of 3 to 100 rad: a quantitative study. *J.Radiat.Res.(Tokyo)* 24:259-269.
158. Inouye, M., M. Tamaru, and Y. Kameyama. 1992. Effects of cycloheximide and actinomycin D on radiation-induced apoptotic cell death in the developing mouse cerebellum. *Int.J.Radiat.Biol.* 61:669-674.
159. Irving, B. A., F. W. Alt, and N. Killeen. 1998. Thymocyte development in the absence of pre-T cell receptor extracellular immunoglobulin domains. *Science* 280:905-908.
160. Ito, M. *The cerebellum and neural control* (New York: Raven). 1984. Ref Type: Generic
161. Iwata, M., S. Hanaoka, and K. Sato. 1991. Rescue of thymocytes and T cell hybridomas from glucocorticoid-induced apoptosis by stimulation via the T cell receptor/CD3 complex: a possible in vitro model for positive selection of the T cell repertoire. *Eur.J.Immunol.* 21:643-648.
162. Jacks, T., L. Remington, B. O. Williams, E. M. Schmitt, S. Halachmi, R. T. Bronson, and R. A. Weinberg. 1994. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr.Biol.* 4:1-7.
163. Janeway C.A., Travers .J., Walport M., and Capra D.J. *ImmunoBiology: The Immune System in Health and Disease* (Elsevier Science/Galrand, NY ed 4). 1999. Ref Type: Generic
164. Jeffrey, P. D., A. A. Russo, K. Polyak, E. Gibbs, J. Hurwitz, J. Massague, and N. P. Pavletich. 1995. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 376:313-320.
165. Jen, K. Y. and V. G. Cheung. 2005. Identification of novel p53 target genes in ionizing radiation response. *Cancer Res.* 65:7666-7673.

166. Jimenez, G. S., M. Nister, J. M. Stommel, M. Beeche, E. A. Barcarse, X. Q. Zhang, S. O'Gorman, and G. M. Wahl. 2000. A transactivation-deficient mouse model provides insights into Trp53 regulation and function. *Nat.Genet.* 26:37-43.
167. Jin, S., M. J. Antinore, F. D. Lung, X. Dong, H. Zhao, F. Fan, A. B. Colchagie, P. Blanck, P. P. Roller, A. J. Fornace, Jr., and Q. Zhan. 2000. The GADD45 inhibition of Cdc2 kinase correlates with GADD45-mediated growth suppression. *J.Biol.Chem.* 275:16602-16608.
168. Jin, Y. H., H. Yim, J. H. Park, and S. K. Lee. 2003. Cdk2 activity is associated with depolarization of mitochondrial membrane potential during apoptosis. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 305:974-980.
169. Jondal, M., A. Pazirandeh, and S. Okret. 2004. Different roles for glucocorticoids in thymocyte homeostasis? *Trends Immunol.* 25:595-600.
170. Jones, S. N., A. E. Roe, L. A. Donehower, and A. Bradley. 1995. Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* 378:206-208.
171. Ju, G. Z., X. M. Wang, S. B. Fu, and S. Z. Liu. 2003. Effect of ionizing radiation on the expression of p16, cyclinD1 and CDK4 in mouse thymocytes and splenocytes. *Biomed.Environ.Sci.* 16:47-52.
172. Ju, G. Z., X. M. Wang, S. B. Fu, and S. Z. Liu. 2003. Effect of ionizing radiation on the expression of p16, cyclinD1 and CDK4 in mouse thymocytes and splenocytes. *Biomed.Environ.Sci.* 16:47-52.
173. Kanemori, Y., K. Uto, and N. Sagata. 2005. Beta-TrCP recognizes a previously undescribed nonphosphorylated destruction motif in Cdc25A and Cdc25B phosphatases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102:6279-6284.
174. Kang, J., D. Ferguson, H. Song, C. Bassing, M. Eckersdorff, F. W. Alt, and Y. Xu. 2005. Functional interaction of H2AX, NBS1, and p53 in ATM-dependent DNA damage responses and tumor suppression. *Mol.Cell Biol.* 25:661-670.
175. Karin, M. and Y. Ben Neriah. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu.Rev.Immunol.* 18:621-663.
176. Kastan, M. B., O. Onyekwere, D. Sidransky, B. Vogelstein, and R. W. Craig. 1991. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 51:6304-6311.
177. Kaufman M.H. *The Atlas of Mouse Development* (Elsevier Academic Press). 1992. Ref Type: Generic
178. Kesavapany, S., B. S. Li, N. Amin, Y. L. Zheng, P. Grant, and H. C. Pant. - Neuronal cyclin-dependent kinase 5: role in nervous system function and its specific inhibition by the Cdk5 inhibitory peptide.-2.
179. Khosravi, R., R. Maya, T. Gottlieb, M. Oren, Y. Shiloh, and D. Shkedy. 1999. Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:14973-14977.
180. Kimura, S. H., M. Ikawa, A. Ito, M. Okabe, and H. Nojima. 2001. Cyclin G1 is involved in G2/M arrest in response to DNA damage and in growth control after damage recovery. *Oncogene* 20:3290-3300.
181. King, K. L. and J. A. Cidlowski. 1995. Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death. *J.Cell Biochem.* 58:175-180.

182. Kiyokawa, H., R. D. Kineman, K. O. Manova-Todorova, V. C. Soares, E. S. Hoffman, M. Ono, D. Khanam, A. C. Hayday, L. A. Frohman, and A. Koff. 1996. Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell* 85:721-732.
183. Klein, L., T. Klein, U. Ruther, and B. Kyewski. 1998. CD4 T cell tolerance to human C-reactive protein, an inducible serum protein, is mediated by medullary thymic epithelium. *J.Exp.Med.* 188:5-16.
184. Klein, P. S. and D. A. Melton. 1996. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:8455-8459.
185. Knuutila, S., Y. Aalto, K. Autio, A. M. Bjorkqvist, W. El Rifai, S. Hemmer, T. Huhta, E. Kettunen, S. Kiuru-Kuhlefelt, M. L. Larramendy, T. Lushnikova, O. Monni, H. Pere, J. Tapper, M. Tarkkanen, A. Varis, V. M. Wasenius, M. Wolf, and Y. Zhu. 1999. DNA copy number losses in human neoplasms. *Am.J.Pathol.* 155:683-694.
186. Ko, L. J. and C. Prives. 1996. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* 10:1054-1072.
187. Kobet, E., X. Zeng, Y. Zhu, D. Keller, and H. Lu. 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* 97:12547-12552.
188. Koepf, D. M., J. W. Harper, and S. J. Elledge. 1999. How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell* 97:431-434.
189. Koepf, D. M., L. K. Schaefer, X. Ye, K. Keyomarsi, C. Chu, J. W. Harper, and S. J. Elledge. 2001. Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science* 294:173-177.
190. Kokontis, J. M., A. J. Wagner, M. O'Leary, S. Liao, and N. Hay. 2001. A transcriptional activation function of p53 is dispensable for and inhibitory of its apoptotic function. *Oncogene* 20:659-668.
191. Komarova, E. A., M. V. Chernov, R. Franks, K. Wang, G. Armin, C. R. Zelnick, D. M. Chin, S. S. Bacus, G. R. Stark, and A. V. Gudkov. 1997. Transgenic mice with p53-responsive lacZ: p53 activity varies dramatically during normal development and determines radiation and drug sensitivity in vivo. *EMBO J.* 16:1391-1400.
192. Komarova, E. A. and A. V. Gudkov. 2001. Chemoprotection from p53-dependent apoptosis: potential clinical applications of the p53 inhibitors. *Biochem.Pharmacol.* 62:657-667.
193. Kotani, S., T. Endo, M. Kitagawa, H. Higashi, and T. Onaya. 1995. A variant form of cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) in a malignantly transformed rat thyroid (FRTL-Tc) cell line. *Oncogene* 10:663-669.
194. Koundrioukoff, S., Z. O. Jonsson, S. Hasan, R. N. de Jong, P. C. van der Vliet, M. O. Hottiger, and U. Hubscher. 2000. A direct interaction between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Cdk2 targets PCNA-interacting proteins for phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 275:22882-22887.
195. Krause, K., M. Wasner, W. Reinhard, U. Haugwitz, C. L. Dohna, J. Mossner, and K. Engeland. 2000. The tumour suppressor protein p53 can repress transcription of cyclin B. *Nucleic Acids Res.* 28:4410-4418.
196. Krays, V., O. Marinx, G. Shaw, J. Deschamps, and G. Huez. 1989. Translational blockade imposed by cytokine-derived UA-rich sequences. *Science* 245:852-855.
197. Kubbutat, M. H. and K. H. Vousden. 1997. Proteolytic cleavage of human p53 by calpain: a potential regulator of protein stability. *Mol.Cell Biol.* 17:460-468.

198. Kuerbitz, S. J., B. S. Plunkett, W. V. Walsh, and M. B. Kastan. 1992. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:7491-7495.
199. Kuge, H., G. G. Brownlee, P. D. Gershon, and J. D. Richter. 1998. Cap ribose methylation of c-mos mRNA stimulates translation and oocyte maturation in *Xenopus laevis*. *Nucleic Acids Res.* 26:3208-3214.
200. Kuge, H. and J. D. Richter. 1995. Cytoplasmic 3' poly(A) addition induces 5' cap ribose methylation: implications for translational control of maternal mRNA. *EMBO J.* 14:6301-6310.
201. Kuhar, S. G., L. Feng, S. Vidan, M. E. Ross, M. E. Hatten, and N. Heintz. 1993. Changing patterns of gene expression define four stages of cerebellar granule neuron differentiation. *Development* 117:97-104.
202. Kulikov, R., K. A. Boehme, and C. Blattner. 2005. Glycogen synthase kinase 3-dependent phosphorylation of Mdm2 regulates p53 abundance. *Mol.Cell Biol.* 25:7170-7180.
203. Lain, S., C. Midgley, A. Sparks, E. B. Lane, and D. P. Lane. 1999. An inhibitor of nuclear export activates the p53 response and induces the localization of HDM2 and p53 to U1A-positive nuclear bodies associated with the PODs. *Exp.Cell Res.* 248:457-472.
204. Lakin, N. D., B. C. Hann, and S. P. Jackson. 1999. The ataxia-telangiectasia related protein ATR mediates DNA-dependent phosphorylation of p53. *Oncogene* 18:3989-3995.
205. Langa, F., I. Lafon, S. Vandormael-Pournin, M. Vidaud, C. Babinet, and D. Morello. 2001. Healthy mice with an altered c-myc gene: role of the 3' untranslated region revisited. *Oncogene* 20:4344-4353.
206. Lange, W. 1975. Cell number and cell density in the cerebellar cortex of man and some other mammals. *Cell Tissue Res.* 157:115-124.
207. Larochelle, S., J. Chen, R. Knights, J. Pandur, P. Morcillo, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, B. Suter, and R. P. Fisher. 2001. T-loop phosphorylation stabilizes the CDK7-cyclin H-MAT1 complex in vivo and regulates its CTD kinase activity. *EMBO J.* 20:3749-3759.
208. Larsson, L., E. Timms, K. Blight, D. E. Restall, P. S. Jat, and A. G. Fisher. 1991. Characterization of murine thymic stromal-cell lines immortalized by temperature-sensitive simian virus 40 large T or adenovirus 5 E1a. *Dev.Immunol.* 1:279-293.
209. Lassus, P., M. Ferlin, J. Piette, and U. Hibner. 1996. Anti-apoptotic activity of low levels of wild-type p53. *EMBO J.* 15:4566-4573.
210. Le Panse, R. and S. Berrih-Aknin. 2005. Thymic myoid cells protect thymocytes from apoptosis and modulate their differentiation: implication of the ERK and Akt signaling pathways. *Cell Death.Differ.* 12:463-472.
211. Lev Bar-Or, R., R. Maya, L. A. Segel, U. Alon, A. J. Levine, and M. Oren. 2000. Generation of oscillations by the p53-Mdm2 feedback loop: a theoretical and experimental study. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:11250-11255.
212. Levine, A. J. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88:323-331.
213. Levkau, B., H. Koyama, E. W. Raines, B. E. Clurman, B. Herren, K. Orth, J. M. Roberts, and R. Ross. 1998. Cleavage of p21Cip1/Waf1 and p27Kip1 mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdk2: role of a caspase cascade. *Mol.Cell* 1:553-563.

214. Li, L., M. Ljungman, and J. E. Dixon. 2000. The human Cdc14 phosphatases interact with and dephosphorylate the tumor suppressor protein p53. *J.Biol.Chem.* 275:2410-2414.
215. Liao, C. B., Y. C. Chang, C. W. Kao, E. S. Taniga, H. Li, B. S. Tzang, and Y. C. Liu. 2006. Deregulation of cyclin-dependent kinase 2 activity correlates with UVC-induced apoptosis in Chinese hamster ovary cells. *J.Cell Biochem.* 97:824-835.
216. Liu, D., M. M. Matzuk, W. K. Sung, Q. Guo, P. Wang, and D. J. Wolgemuth. - Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse.-80.
217. Liu, K., J. Husler, J. Ye, S. S. Leonard, D. Cutler, F. Chen, S. Wang, Z. Zhang, M. Ding, L. Wang, and X. Shi. 2001. On the mechanism of Cr (VI)-induced carcinogenesis: dose dependence of uptake and cellular responses. *Mol.Cell Biochem.* 222:221-229.
218. Ljungman, M. 2000. Dial 9-1-1 for p53: mechanisms of p53 activation by cellular stress. *Neoplasia.* 2:208-225.
219. Lohrum, M. and K. H. Scheidtmann. 1996. Differential effects of phosphorylation of rat p53 on transactivation of promoters derived from different p53 responsive genes. *Oncogene* 13:2527-2539.
220. Lohrum, M. A., M. Ashcroft, M. H. Kubbutat, and K. H. Vousden. 2000. Identification of a cryptic nucleolar-localization signal in MDM2. *Nat.Cell Biol.* 2:179-181.
221. Love, P. E. and E. W. Shores. 2000. ITAM multiplicity and thymocyte selection: how low can you go? *Immunity.* 12:591-597.
222. Lowe, S. W., E. M. Schmitt, S. W. Smith, B. A. Osborne, and T. Jacks. 1993. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362:847-849.
223. Mack, D. H., J. Vartikar, J. M. Pipas, and L. A. Laimins. 1993. Specific repression of TATA-mediated but not initiator-mediated transcription by wild-type p53. *Nature* 363:281-283.
224. MacLachlan, T. K. and W. S. El Deiry. 2002. Apoptotic threshold is lowered by p53 transactivation of caspase-6. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:9492-9497.
225. Mader, S., H. Lee, A. Pause, and N. Sonenberg. 1995. The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol.Cell Biol.* 15:4990-4997.
226. Maecker, H. L., C. Koumenis, and A. J. Giaccia. 2000. p53 promotes selection for Fas-mediated apoptotic resistance. *Cancer Res.* 60:4638-4644.
227. Magavi, S. S., B. R. Leavitt, and J. D. Macklis. 2000. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 405:951-955.
228. Malumbres, M. and M. Barbacid. 2005. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem.Sci.* 30:630-641.
229. Mann, C. L., F. M. Hughes, Jr., and J. A. Cidlowski. 2000. Delineation of the signaling pathways involved in glucocorticoid-induced and spontaneous apoptosis of rat thymocytes. *Endocrinology* 141:528-538.
230. Mantovani, F. and L. Banks. 2003. Regulation of the discs large tumor suppressor by a phosphorylation-dependent interaction with the beta-TrCP ubiquitin ligase receptor. *J.Biol.Chem.* 278:42477-42486.

231. Marchenko, N. D., A. Zaika, and U. M. Moll. 2000. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J.Biol.Chem.* 275:16202-16212.
232. Mariathasan, S., A. Zakarian, D. Bouchard, A. M. Michie, J. C. Zuniga-Pflucker, and P. S. Ohashi. 2001. Duration and strength of extracellular signal-regulated kinase signals are altered during positive versus negative thymocyte selection. *J.Immunol.* 167:4966-4973.
233. Marsden, V. S., L. O'Connor, L. A. O'Reilly, J. Silke, D. Metcalf, P. G. Ekert, D. C. Huang, F. Cecconi, K. Kuida, K. J. Tomaselli, S. Roy, D. W. Nicholson, D. L. Vaux, P. Bouillet, J. M. Adams, and A. Strasser. 2002. Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature* 419:634-637.
234. Marshall, C. J. 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80:179-185.
235. Matsumoto, Y., K. Kim, J. Hurwitz, R. Gary, D. S. Levin, A. E. Tomkinson, and M. S. Park. 1999. Reconstitution of proliferating cell nuclear antigen-dependent repair of apurinic/aprimidinic sites with purified human proteins. *J.Biol.Chem.* 274:33703-33708.
236. McCarty, N., M. L. Shinohara, L. Lu, and H. Cantor. 2004. Detailed analysis of gene expression during development of T cell lineages in the thymus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:9339-9344.
237. McGrew, L. L. and J. D. Richter. 1990. Translational control by cytoplasmic polyadenylation during *Xenopus* oocyte maturation: characterization of cis and trans elements and regulation by cyclin/MPF. *EMBO J.* 9:3743-3751.
238. McKeithan, T. W. 1995. Kinetic proofreading in T-cell receptor signal transduction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92:5042-5046.
239. Meijer, L. 1996. Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Cell Biol.* 6:393-397.
240. Meijer, L., A. Borgne, O. Mulner, J. P. Chong, J. J. Blow, N. Inagaki, M. Inagaki, J. G. Delcros, and J. P. Moulino. 1997. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur.J.Biochem.* 243:527-536.
241. Mendez, R., K. G. Murthy, K. Ryan, J. L. Manley, and J. D. Richter. 2000. Phosphorylation of CPEB by Eg2 mediates the recruitment of CPSF into an active cytoplasmic polyadenylation complex. *Mol.Cell* 6:1253-1259.
242. Mendez, R. and J. D. Richter. 2001. Translational control by CPEB: a means to the end. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2:521-529.
243. Merritt, A. J., T. D. Allen, C. S. Potten, and J. A. Hickman. 1997. Apoptosis in small intestinal epithelial from p53-null mice: evidence for a delayed, p53-independent G2/M-associated cell death after gamma-irradiation. *Oncogene* 14:2759-2766.
244. Merritt, A. J., C. S. Potten, C. J. Kemp, J. A. Hickman, A. Balmain, D. P. Lane, and P. A. Hall. 1994. The role of p53 in spontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53-deficient mice. *Cancer Res.* 54:614-617.
245. Mesnard-Rouiller, L., J. Bismuth, A. Wakkach, S. Poëa-Guyon, and S. Berrih-Aknin. 2004. Thymic myoid cells express high levels of muscle genes. *J.Neuroimmunol.* 148:97-105.
246. Midgley, C. A., J. M. Desterro, M. K. Saville, S. Howard, A. Sparks, R. T. Hay, and D. P. Lane. 2000. An N-terminal p14ARF peptide blocks Mdm2-dependent ubiquitination in vitro and can activate p53 in vivo. *Oncogene* 19:2312-2323.

247. Midgley, C. A., B. Owens, C. V. Briscoe, D. B. Thomas, D. P. Lane, and P. A. Hall. 1995. Coupling between gamma irradiation, p53 induction and the apoptotic response depends upon cell type in vivo. *J.Cell Sci.* 108 (Pt 5):1843-1848.
248. Migliorini, D., D. Danovi, E. Colombo, R. Carbone, P. G. Pelicci, and J. C. Marine. 2002. Hdmx recruitment into the nucleus by Hdm2 is essential for its ability to regulate p53 stability and transactivation. *J.Biol.Chem.* 277:7318-7323.
249. Mihara, M., S. Erster, A. Zaika, O. Petrenko, T. Chittenden, P. Pancoska, and U. M. Moll. 2003. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol.Cell* 11:577-590.
250. Miyashita, T., S. Krajewski, M. Krajewska, H. G. Wang, H. K. Lin, D. A. Liebermann, B. Hoffman, and J. C. Reed. 1994. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9:1799-1805.
251. Momand, J., G. P. Zambetti, D. C. Olson, D. George, and A. J. Levine. 1992. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69:1237-1245.
252. Monje, M. L., S. Mizumatsu, J. R. Fike, and T. D. Palmer. 2002. Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction. *Nat.Med.* 8:955-962.
253. Monje, M. L. and T. Palmer. 2003. Radiation injury and neurogenesis. *Curr.Opin.Neurol.* 16:129-134.
254. Monje, M. L., H. Toda, and T. D. Palmer. 2003. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 302:1760-1765.
255. Montes de Oca, L. R., D. S. Wagner, and G. Lozano. 1995. Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature* 378:203-206.
256. Moore, N. C., E. J. Jenkinson, and J. J. Owen. 1992. Effects of the thymic microenvironment on the response of thymocytes to stimulation. *Eur.J.Immunol.* 22:2533-2537.
257. Morgan, D. O. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature* 374:131-134.
258. Morgan, D. O. and H. L. De Bondt. 1994. Protein kinase regulation: insights from crystal structure analysis. *Curr.Opin.Cell Biol.* 6:239-246.
259. Muller, S., M. Berger, F. Lehenbre, J. S. Seeler, Y. Haupt, and A. Dejean. 2000. c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J.Biol.Chem.* 275:13321-13329.
260. Muller, S. J. and S. Caradonna. 1991. Isolation and characterization of a human cDNA encoding uracil-DNA glycosylase. *Biochim.Biophys.Acta* 1088:197-207.
261. Muller, S. J. and S. Caradonna. 1993. Cell cycle regulation of a human cyclin-like gene encoding uracil-DNA glycosylase. *J.Biol.Chem.* 268:1310-1319.
262. Muller-Weeks, S. J. and S. Caradonna. 1996. Specific association of cyclin-like uracil-DNA glycosylase with the proliferating cell nuclear antigen. *Exp.Cell Res.* 226:346-355.
263. Murga, C. and D. F. Barber. 2002. Molecular mechanisms of pre-T cell receptor-induced survival. *J.Biol.Chem.* 277:39156-39162.
264. Murphy, M., J. Ahn, K. K. Walker, W. H. Hoffman, R. M. Evans, A. J. Levine, and D. L. George. 1999. Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev.* 13:2490-2501.

265. Murphy, M., M. G. Stinnakre, C. Senamaud-Beaufort, N. J. Winston, C. Sweeney, M. Kubelka, M. Carrington, C. Brechot, and J. Sobczak-Thepot. 1997. Delayed early embryonic lethality following disruption of the murine cyclin A2 gene. *Nat.Genet.* 15:83-86.
266. Murray, A. 1995. Cyclin ubiquitination: the destructive end of mitosis. *Cell* 81:149-152.
267. Murray, A. W. 2004. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116:221-234.
268. Murray, A. W. and D. Marks. 2001. Can sequencing shed light on cell cycling? *Nature* 409:844-846.
269. Nakamura, S., J. A. Roth, and T. Mukhopadhyay. 2000. Multiple lysine mutations in the C-terminal domain of p53 interfere with MDM2-dependent protein degradation and ubiquitination. *Mol.Cell Biol.* 20:9391-9398.
270. Nakano, K. and K. H. Vousden. 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol.Cell* 7:683-694.
271. Nakatomi, H., T. Kuriu, S. Okabe, S. Yamamoto, O. Hatano, N. Kawahara, A. Tamura, T. Kirino, and M. Nakafuku. 2002. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 110:429-441.
272. Nebreda, A. R. and I. Ferby. 2000. Regulation of the meiotic cell cycle in oocytes. *Curr.Opin.Cell Biol.* 12:666-675.
273. Neddermann, P. and J. Jiricny. 1994. Efficient removal of uracil from G.U mispairs by the mismatch-specific thymine DNA glycosylase from HeLa cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91:1642-1646.
274. Neumann, A. K., J. Yang, M. P. Biju, S. K. Joseph, R. S. Johnson, V. H. Haase, B. D. Freedman, and L. A. Turka. - Hypoxia inducible factor 1 alpha regulates T cell receptor signal transduction.-6.
275. Nguyen, M. D., W. E. Mushynski, and J. P. Julien. 2002. Cycling at the interface between neurodevelopment and neurodegeneration. *Cell Death.Differ.* 9:1294-1306.
276. Nguyen, M. D., W. E. Mushynski, and J. P. Julien. 2002. Cycling at the interface between neurodevelopment and neurodegeneration. *Cell Death.Differ.* 9:1294-1306.
277. Nilsen, H., M. Otterlei, T. Haug, K. Solum, T. A. Nagelhus, F. Skorpen, and H. E. Krokan. 1997. Nuclear and mitochondrial uracil-DNA glycosylases are generated by alternative splicing and transcription from different positions in the UNG gene. *Nucleic Acids Res.* 25:750-755.
278. Noguchi, E., T. Sekiguchi, K. Yamashita, and T. Nishimoto. 1993. Molecular cloning and identification of two types of hamster cyclin-dependent kinases: cdk2 and cdk2L. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 197:1524-1529.
279. Nugent, J. H., C. E. Alfa, T. Young, and J. S. Hyams. 1991. Conserved structural motifs in cyclins identified by sequence analysis. *J.Cell Sci.* 99 (Pt 3):669-674.
280. O'Reilly, M. A., R. J. Staversky, R. H. Watkins, and W. M. Maniscalco. 1998. Accumulation of p21(Cip1/WAF1) during hyperoxic lung injury in mice. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 19:777-785.
281. O'Reilly, M. A., R. J. Staversky, R. H. Watkins, C. K. Reed, K. L. Mesy Jensen, J. N. Finkelstein, and P. C. Keng. 2001. The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 protects the lung from oxidative stress. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 24:703-710.

282. Oda, K., H. Arakawa, T. Tanaka, K. Matsuda, C. Tanikawa, T. Mori, H. Nishimori, K. Tamai, T. Tokino, Y. Nakamura, and Y. Taya. 2000. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* 102:849-862.
283. Ogas, J., B. J. Andrews, and I. Herskowitz. 1991. Transcriptional activation of CLN1, CLN2, and a putative new G1 cyclin (HCS26) by SWI4, a positive regulator of G1-specific transcription. *Cell* 66:1015-1026.
284. Ohashi, P. S., H. Pircher, K. Burki, R. M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 1990. Distinct sequence of negative or positive selection implied by thymocyte T-cell receptor densities. *Nature* 346:861-863.
285. Ohtsubo, M., A. M. Theodoras, J. Schumacher, J. M. Roberts, and M. Pagano. 1995. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol.Cell Biol.* 15:2612-2624.
286. Ortega, S., I. Prieto, J. Odajima, A. Martin, P. Dubus, R. Sotillo, J. L. Barbero, M. Malumbres, and M. Barbacid. 2003. Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat.Genet.* 35:25-31.
287. Otterlei, M., E. Warbrick, T. A. Nagelhus, T. Haug, G. Slupphaug, M. Akbari, P. A. Aas, K. Steinsbekk, O. Bakke, and H. E. Krokan. 1999. Post-replicative base excision repair in replication foci. *EMBO J.* 18:3834-3844.
288. Owen-Schaub, L. B., W. Zhang, J. C. Cusack, L. S. Angelo, S. M. Santee, T. Fujiwara, J. A. Roth, A. B. Deisseroth, W. W. Zhang, E. Kruzel, and . 1995. Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol.Cell Biol.* 15:3032-3040.
289. Page, D. M., E. M. Roberts, J. J. Peschon, and S. M. Hedrick. 1998. TNF receptor-deficient mice reveal striking differences between several models of thymocyte negative selection. *J.Immunol.* 160:120-133.
290. Palmer, E. 2003. Negative selection—clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat.Rev.Immunol.* 3:383-391.
291. Palmer, T. D., J. Takahashi, and F. H. Gage. 1997. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol.Cell Neurosci.* 8:389-404.
292. Papadopoulos, N., C. Simopoulos, A. Kotini, M. Lambropoulou, I. Tolparidou, and D. Tamiolakis. 2001. Differential expression of alpha-smooth muscle actin molecule in a subset of bone marrow stromal cells, in b-cell chronic lymphocytic leukemia, autoimmune disorders and normal fetuses. *Eur.J.Gynaecol.Oncol.* 22:447-450.
293. Parada, Y., L. Banerji, J. Glassford, N. C. Lea, M. Collado, C. Rivas, J. L. Lewis, M. Y. Gordon, N. S. Thomas, and E. W. Lam. 2001. BCR-ABL and interleukin 3 promote haematopoietic cell proliferation and survival through modulation of cyclin D2 and p27Kip1 expression. *J.Biol.Chem.* 276:23572-23580.
294. Parant, J., A. Chavez-Reyes, N. A. Little, W. Yan, V. Reinke, A. G. Jochemsen, and G. Lozano. 2001. Rescue of embryonic lethality in Mdm4-null mice by loss of Trp53 suggests a nonoverlapping pathway with MDM2 to regulate p53. *Nat.Genet.* 29:92-95.
295. Parant, J. M., V. Reinke, B. Mims, and G. Lozano. 2001. Organization, expression, and localization of the murine mdmx gene and pseudogene. *Gene* 270:277-283.
296. Passalaris, T. M., J. A. Benanti, L. Gewin, T. Kiyono, and D. A. Galloway. 1999. The G(2) checkpoint is maintained by redundant pathways. *Mol.Cell Biol.* 19:5872-5881.

297. Paull, T. T., E. P. Rogakou, V. Yamazaki, C. U. Kirchgessner, M. Gellert, and W. M. Bonner. 2000. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr.Biol.* 10:886-895.
298. Peeper, D. S., L. L. Parker, M. E. Ewen, M. Toebes, F. L. Hall, M. Xu, A. Zantema, A. J. van der Eb, and H. Piwnica-Worms. 1993. A- and B-type cyclins differentially modulate substrate specificity of cyclin-cdk complexes. *EMBO J.* 12:1947-1954.
299. Petrie, H. T. 2002. Role of thymic organ structure and stromal composition in steady-state postnatal T-cell production. *Immunol.Rev.* 189:8-19.
300. Pines, J. 1995. Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem.J.* 308 (Pt 3):697-711.
301. Pluquet, O. and P. Hainaut. 2001. Genotoxic and non-genotoxic pathways of p53 induction. *Cancer Lett.* 174:1-15.
302. Polyak, K., T. Waldman, T. C. He, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1996. Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest. *Genes Dev.* 10:1945-1952.
303. Polyak, K., Y. Xia, J. L. Zweier, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1997. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389:300-305.
304. Porritt, H. E., K. L. Anderson, R. K. Suniara, E. J. Jenkinson, and J. J. Owen. 1998. Cellular interactions in the thymus regulate the protein kinase C signaling pathway. *Eur.J.Immunol.* 28:1197-1203.
305. Porter, L. A., I. H. Cukier, and J. M. Lee. 2003. Nuclear localization of cyclin B1 regulates DNA damage-induced apoptosis. *Blood* 101:1928-1933.
306. Potten CS. Structure, function and proliferative organisation of mammalian gut (Edited by CS Potten, JH Hendry.Amsterdam, Elsevier Science BV). 1-31. 2006. Ref Type: Generic
307. Powell, S. N., J. S. DeFrank, P. Connell, M. Eogan, F. Preffer, D. Dombkowski, W. Tang, and S. Friend. 1995. Differential sensitivity of p53(-) and p53(+) cells to caffeine-induced radiosensitization and override of G2 delay. *Cancer Res.* 55:1643-1648.
308. Powers, J. T., S. Hong, C. N. Mayhew, P. M. Rogers, E. S. Knudsen, and D. G. Johnson. 2004. E2F1 uses the ATM signaling pathway to induce p53 and Chk2 phosphorylation and apoptosis. *Mol.Cancer Res.* 2:203-214.
309. Prives, C. and P. A. Hall. 1999. The p53 pathway. *J.Pathol.* 187:112-126.
310. Rauth, A. M. - Evidence for dark-reactivation of ultraviolet light damage in mouse L cells.- 38.
311. Ravnik, S. E. and D. J. Wolgemuth. 1999. Regulation of meiosis during mammalian spermatogenesis: the A-type cyclins and their associated cyclin-dependent kinases are differentially expressed in the germ-cell lineage. *Dev.Biol.* 207:408-418.
312. Resnitzky, D., M. Gossen, H. Bujard, and S. I. Reed. 1994. Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol.Cell Biol.* 14:1669-1679.
313. Ronen, D., D. Schwartz, Y. Teitz, N. Goldfinger, and V. Rotter. 1996. Induction of HL-60 cells to undergo apoptosis is determined by high levels of wild-type p53 protein whereas differentiation of the cells is mediated by lower p53 levels. *Cell Growth Differ.* 7:21-30.

314. Rossi, F., A. Ferraresi, P. Romagni, L. Silvestroni, and V. Santemma. 2002. Angiotensin II stimulates contraction and growth of testicular peritubular myoid cells in vitro. *Endocrinology* 143:3096-3104.
315. Rudolph, N. S. and S. A. Latt. 1989. Flow cytometric analysis of X-ray sensitivity in ataxia telangiectasia. *Mutat.Res.* 211:31-41.
316. Russell, K. J., L. W. Wiens, G. W. Demers, D. A. Galloway, S. E. Plon, and M. Groudine. 1995. Abrogation of the G2 checkpoint results in differential radiosensitization of G1 checkpoint-deficient and G1 checkpoint-competent cells. *Cancer Res.* 55:1639-1642.
317. Sabbatini, P. and F. McCormick. 2002. MDMX inhibits the p300/CBP-mediated acetylation of p53. *DNA Cell Biol.* 21:519-525.
318. Sah, V. P., L. D. Attardi, G. J. Mulligan, B. O. Williams, R. T. Bronson, and T. Jacks. 1995. A subset of p53-deficient embryos exhibit exencephaly. *Nat.Genet.* 10:175-180.
319. Sakaguchi, K., J. E. Herrera, S. Saito, T. Miki, M. Bustin, A. Vassilev, C. W. Anderson, and E. Appella. 1998. DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev.* 12:2831-2841.
320. Sakaguchi, K., S. Saito, Y. Higashimoto, S. Roy, C. W. Anderson, and E. Appella. 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.* 275:9278-9283.
321. Sakaguchi, K., H. Sakamoto, M. S. Lewis, C. W. Anderson, J. W. Erickson, E. Appella, and D. Xie. 1997. Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53. *Biochemistry* 36:10117-10124.
322. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, J. Shimizu, S. Yamazaki, T. Sakihama, M. Itoh, Y. Kuniyasu, T. Nomura, M. Toda, and T. Takahashi. 2001. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol.Rev.* 182:18-32.
323. Sambrook and Russell. *Molecular Cloning: a laboratory manual (third edition)*. 2006. Ref Type: Generic
324. Santoni-Rugiu, E., J. Falck, N. Mailand, J. Bartek, and J. Lukas. 2000. Involvement of Myc activity in a G(1)/S-promoting mechanism parallel to the pRb/E2F pathway. *Mol Cell Biol* 20:3497-3509.
325. Sax, J. K., P. Fei, M. E. Murphy, E. Bernhard, S. J. Korsmeyer, and W. S. El Deiry. 2002. BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat.Cell Biol.* 4:842-849.
326. Schnierle, B. S., P. D. Gershon, and B. Moss. 1992. Cap-specific mRNA (nucleoside-O2'-)-methyltransferase and poly(A) polymerase stimulatory activities of vaccinia virus are mediated by a single protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:2897-2901.
327. Schwartz, D., N. Goldfinger, and V. Rotter. 1993. Expression of p53 protein in spermatogenesis is confined to the tetraploid pachytene primary spermatocytes. *Oncogene* 8:1487-1494.
328. Sedwick R.P. and Boder E. *Handbook of Clinical Neurology*. 347-423. 1991. Ref Type: Generic
329. Seo, Y. R. and H. J. Jung. 2004. The potential roles of p53 tumor suppressor in nucleotide excision repair (NER) and base excision repair (BER). *Exp.Mol.Med.* 36:505-509.
330. Seoane, J., H. V. Le, and J. Massague. 2002. Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* 419:729-734.

331. Seufert, W., B. Futcher, and S. Jentsch. 1995. Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. *Nature* 373:78-81.
332. Sharp, D. A., S. A. Kratowicz, M. J. Sank, and D. L. George. 1999. Stabilization of the MDM2 oncoprotein by interaction with the structurally related MDMX protein. *J.Biol.Chem.* 274:38189-38196.
333. Shaulsky, G., N. Goldfinger, M. S. Tosky, A. J. Levine, and V. Rotter. 1991. Nuclear localization is essential for the activity of p53 protein. *Oncogene* 6:2055-2065.
334. Sherr, C. J. 1993. Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73:1059-1065.
335. Sherr, C. J. 1994. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79:551-555.
336. Sherr, C. J. 1995. D-type cyclins. *Trends Biochem.Sci.* 20:187-190.
337. Sherr, C. J. and J. M. Roberts. 1995. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 9:1149-1163.
338. Sherr, C. J. and J. M. Roberts. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13:1501-1512.
339. Sherr, C. J. and J. M. Roberts. 2004. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 18:2699-2711.
340. Shieh, S. Y., J. Ahn, K. Tamai, Y. Taya, and C. Prives. 2000. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev.* 14:289-300.
341. Shors, T. J., G. Miesegaes, A. Beylin, M. Zhao, T. Rydel, and E. Gould. 2001. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410:372-376.
342. Singer, J. D., M. Gurian-West, B. Clurman, and J. M. Roberts. 1999. Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells. *Genes Dev.* 13:2375-2387.
343. Sionov, R. V. and Y. Haupt. 1999. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* 18:6145-6157.
344. Sjoblom, T. and J. Lahdetie. 1996. Expression of p53 in normal and gamma-irradiated rat testis suggests a role for p53 in meiotic recombination and repair. *Oncogene* 12:2499-2505.
345. Skowyra, D., K. L. Craig, M. Tyers, S. J. Elledge, and J. W. Harper. 1997. F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* 91:209-219.
346. Slichenmyer, W. J., W. G. Nelson, R. J. Slebos, and M. B. Kastan. 1993. Loss of a p53-associated G1 checkpoint does not decrease cell survival following DNA damage. *Cancer Res.* 53:4164-4168.
347. Smith, M. L., J. M. Ford, M. C. Hollander, R. A. Bortnick, S. A. Amundson, Y. R. Seo, C. X. Deng, P. C. Hanawalt, and A. J. Fornace, Jr. 2000. p53-mediated DNA repair responses to UV radiation: studies of mouse cells lacking p53, p21, and/or gadd45 genes. *Mol.Cell Biol.* 20:3705-3714.
348. Smits, V. A., R. Klompaker, T. Vallenius, G. Rijksen, T. P. Makela, and R. H. Medema. 2000. p21 inhibits Thr161 phosphorylation of Cdc2 to enforce the G2 DNA damage checkpoint. *J.Biol.Chem.* 275:30638-30643.

349. Sommers, C. L., C. S. Park, J. Lee, C. Feng, C. L. Fuller, A. Grinberg, J. A. Hildebrand, E. Lacana, R. K. Menon, E. W. Shores, L. E. Samelson, and P. E. Love. 2002. A LAT mutation that inhibits T cell development yet induces lymphoproliferation. *Science* 296:2040-2043.
350. Song, H., N. Hanlon, N. R. Brown, M. E. Noble, L. N. Johnson, and D. Barford. 2001. Phosphoprotein-protein interactions revealed by the crystal structure of kinase-associated phosphatase in complex with phosphoCDK2. *Mol.Cell* 7:615-626.
351. Spain, L. M. and L. J. Berg. 1992. Developmental regulation of thymocyte susceptibility to deletion by "self"-peptide. *J.Exp.Med.* 176:213-223.
352. Sprent, J. and H. Kishimoto. 2001. The thymus and central tolerance. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 356:609-616.
353. Spruck, C. H., K. A. Won, and S. I. Reed. 1999. Deregulated cyclin E induces chromosome instability. *Nature* 401:297-300.
354. Stambolic, V., D. MacPherson, D. Sas, Y. Lin, B. Snow, Y. Jang, S. Benchimol, and T. W. Mak. 2001. Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol.Cell* 8:317-325.
355. Stambolic, V., L. Ruel, and J. R. Woodgett. 1996. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr.Biol.* 6:1664-1668.
356. Starr, T. K., S. C. Jameson, and K. A. Hogquist. 2003. Positive and negative selection of T cells. *Annu.Rev.Immunol.* 21:139-176.
357. Stebbins-Boaz, B., Q. Cao, C. H. de Moor, R. Mendez, and J. D. Richter. 1999. Maskin is a CPEB-associated factor that transiently interacts with eIF-4E. *Mol.Cell* 4:1017-1027.
358. Stebbins-Boaz, B., L. E. Hake, and J. D. Richter. 1996. CPEB controls the cytoplasmic polyadenylation of cyclin, Cdk2 and c-mos mRNAs and is necessary for oocyte maturation in *Xenopus*. *EMBO J.* 15:2582-2592.
359. Stewart, N., G. G. Hicks, F. Paraskevas, and M. Mowat. 1995. Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53. *Oncogene* 10:109-115.
360. Strasser, A., A. W. Harris, T. Jacks, and S. Cory. 1994. DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2. *Cell* 79:329-339.
361. Suhonen, J. O., D. A. Peterson, J. Ray, and F. H. Gage. 1996. Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature* 383:624-627.
362. Sweeney, C., M. Murphy, M. Kubelka, S. E. Ravnik, C. F. Hawkins, D. J. Wolgemuth, and M. Carrington. 1996. A distinct cyclin A is expressed in germ cells in the mouse. *Development* 122:53-64.
363. Tanimura, S., S. Ohtsuka, K. Mitsui, K. Shirouzu, A. Yoshimura, and M. Ohtsubo. 1999. MDM2 interacts with MDMX through their RING finger domains. *FEBS Lett.* 447:5-9.
364. Tao, G. Z., L. S. Rott, A. W. Lowe, and M. B. Omary. 2002. Hyposmotic stress induces cell growth arrest via proteasome activation and cyclin/cyclin-dependent kinase degradation. *J.Biol.Chem.* 277:19295-19303.
365. Tarun, S. Z., Jr., S. E. Wells, J. A. Deardorff, and A. B. Sachs. 1997. Translation initiation factor eIF4G mediates in vitro poly(A) tail-dependent translation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:9046-9051.

366. Tay, J., R. Hodgman, and J. D. Richter. 2000. The control of cyclin B1 mRNA translation during mouse oocyte maturation. *Dev.Biol.* 221:1-9.
367. Taylor, M. D., J. R. Roberts, S. S. Leonard, X. Shi, and J. M. Antonini. 2003. Effects of welding fumes of differing composition and solubility on free radical production and acute lung injury and inflammation in rats. *Toxicol.Sci.* 75:181-191.
368. Taylor, S. S. and E. Radzio-Andzelm. 1994. Three protein kinase structures define a common motif. *Structure.* 2:345-355.
369. Taylor, W. R. and G. R. Stark. 2001. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20:1803-1815.
370. Tibbetts, R. S., K. M. Brumbaugh, J. M. Williams, J. N. Sarkaria, W. A. Cliby, S. Y. Shieh, Y. Taya, C. Prives, and R. T. Abraham. 1999. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev.* 13:152-157.
371. Tokino, T., S. Thiagalingam, W. S. El Deiry, T. Waldman, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1994. p53 tagged sites from human genomic DNA. *Hum.Mol.Genet.* 3:1537-1542.
372. Ui, M., T. Okada, K. Hazeki, and O. Hazeki. 1995. Wortmannin as a unique probe for an intracellular signalling protein, phosphoinositide 3-kinase. *Trends Biochem.Sci.* 20:303-307.
373. Unger, T., T. Juven-Gershon, E. Moallem, M. Berger, S. R. Vogt, G. Lozano, M. Oren, and Y. Haupt. 1999. Critical role for Ser20 of human p53 in the negative regulation of p53 by Mdm2. *EMBO J.* 18:1805-1814.
374. Unger, T., R. V. Sionov, E. Moallem, C. L. Yee, P. M. Howley, M. Oren, and Y. Haupt. 1999. Mutations in serines 15 and 20 of human p53 impair its apoptotic activity. *Oncogene* 18:3205-3212.
375. Urlinger, S., U. Baron, M. Thellmann, M. T. Hasan, H. Bujard, and W. Hillen. 2000. Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:7963-7968.
376. Uto, K., D. Inoue, K. Shimuta, N. Nakajo, and N. Sagata. 2004. Chk1, but not Chk2, inhibits Cdc25 phosphatases by a novel common mechanism. *EMBO J.* 23:3386-3396.
377. Vacchio, M. S., V. Papadopoulos, and J. D. Ashwell. 1994. Steroid production in the thymus: implications for thymocyte selection. *J.Exp.Med.* 179:1835-1846.
378. Vallieres, L., I. L. Campbell, F. H. Gage, and P. E. Sawchenko. 2002. Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6. *J.Neurosci.* 22:486-492.
379. van Beek, M. E., J. A. Davids, and D. G. de Rooij. 1986. Nonrandom distribution of mouse spermatogonial stem cells surviving fission neutron irradiation. *Radiat.Res.* 107:11-23.
380. van Beek, M. E., J. A. Davids, H. J. van de Kant, and D. G. de Rooij. 1984. Response to fission neutron irradiation of spermatogonial stem cells in different stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Radiat.Res.* 97:556-569.
381. van Ewijk, W. 1988. Cell surface topography of thymic microenvironments. *Lab Invest* 59:579-590.
382. van Ewijk, W. 1991. T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments. *Annu.Rev.Immunol.* 9:591-615.

383. van Ewijk, W., E. W. Shores, and A. Singer. 1994. Crosstalk in the mouse thymus. *Immunol.Today* 15:214-217.
384. van Ewijk, W., B. Wang, G. Hollander, H. Kawamoto, E. Spanopoulou, M. Itoi, T. Amagai, Y. F. Jiang, W. T. Germeraad, W. F. Chen, and Y. Katsura. 1999. Thymic microenvironments, 3-D versus 2-D? *Semin.Immunol.* 11:57-64.
385. Van Vliet, E., E. J. Jenkinson, R. Kingston, J. J. Owen, and W. van Ewijk. 1985. Stromal cell types in the developing thymus of the normal and nude mouse embryo. *Eur.J.Immunol.* 15:675-681.
386. Vaziri, H., M. D. West, R. C. Allsopp, T. S. Davison, Y. S. Wu, C. H. Arrowsmith, G. G. Poirier, and S. Benchimol. 1997. ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase. *EMBO J.* 16:6018-6033.
387. Vigo, E., H. Muller, E. Prosperini, G. Hateboer, P. Cartwright, M. C. Moroni, and K. Helin. 1999. CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase. *Mol Cell Biol* 19:6379-6395.
388. Vinitzky, A., C. Michaud, J. C. Powers, and M. Orlowski. 1992. Inhibition of the chymotrypsin-like activity of the pituitary multicatalytic proteinase complex. *Biochemistry* 31:9421-9428.
389. Vivanco, I. and C. L. Sawyers. 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat.Rev.Cancer* 2:489-501.
390. Vogelstein, B., D. Lane, and A. J. Levine. 2000. Surfing the p53 network. *Nature* 408:307-310.
391. Vousden, K. H. 2000. p53: death star. *Cell* 103:691-694.
392. Wadgaonkar, R. and T. Collins. 1999. Murine double minute (MDM2) blocks p53-coactivator interaction, a new mechanism for inhibition of p53-dependent gene expression. *J.Biol.Chem.* 274:13760-13767.
393. Wakkach, A., E. Chastre, C. Bruand, S. Cohen-Kaminsky, S. Emami, C. Gespach, and S. Berrih-Aknin. 2001. Phenotypic and functional characterization of human thymic stromal cell lines. *Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand)* 47:167-178.
394. Wakkach, A., S. Poeta, E. Chastre, C. Gespach, F. Lecerf, P. S. De La, S. Tzartos, A. Coulombe, and S. Berrih-Aknin. 1999. Establishment of a human thymic myoid cell line. Phenotypic and functional characteristics. *Am.J.Pathol.* 155:1229-1240.
395. Waldman, T., K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1995. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res.* 55:5187-5190.
396. Wang, Y. and C. Prives. 1995. Increased and altered DNA binding of human p53 by S and G2/M but not G1 cyclin-dependent kinases. *Nature* 376:88-91.
397. Watanabe, N., H. Arai, Y. Nishihara, M. Taniguchi, N. Watanabe, T. Hunter, and H. Osada. 2004. M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCFbeta-TrCP. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:4419-4424.
398. Webb, S. R. and J. Sprent. 1990. Tolerogenicity of thymic epithelium. *Eur.J.Immunol.* 20:2525-2528.
399. Weber, J. D., D. M. Raben, P. J. Phillips, and J. J. Baldassare. 1997. Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase. *Biochem.J.* 326 (Pt 1):61-68.

400. Webley, K., J. A. Bond, C. J. Jones, J. P. Blaydes, A. Craig, T. Hupp, and D. Wynford-Thomas. 2000. Posttranslational modifications of p53 in replicative senescence overlapping but distinct from those induced by DNA damage. *Mol.Cell Biol.* 20:2803-2808.
401. Weinberg, R. A. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81:323-330.
402. Welcker, M., J. Singer, K. R. Loeb, J. Grim, A. Bloecher, M. Gurien-West, B. E. Clurman, and J. M. Roberts. 2003. Multisite phosphorylation by Cdk2 and GSK3 controls cyclin E degradation. *Mol.Cell* 12:381-392.
403. Werlen, G., B. Hausmann, D. Naeher, and E. Palmer. 2003. Signaling life and death in the thymus: timing is everything. *Science* 299:1859-1863.
404. Werlen, G., B. Hausmann, and E. Palmer. 2000. A motif in the alphabeta T-cell receptor controls positive selection by modulating ERK activity. *Nature* 406:422-426.
405. Werlen, G. and E. Palmer. 2002. The T-cell receptor signalosome: a dynamic structure with expanding complexity. *Curr.Opin.Immunol.* 14:299-305.
406. Wheeler, P. R., H. G. Burkitt, and V. G. Daniels. *Functional Histology (Second Edition)*. 2006. Ref Type: Generic
407. Williams, O., G. Gil-Gomez, T. Norton, D. Kioussis, and H. J. Brady. 2000. Activation of Cdk2 is a requirement for antigen-mediated thymic negative selection. *Eur.J.Immunol.* 30:709-713.
408. Wilson, G. M., Y. Sun, J. Sellers, H. Lu, N. Penkar, G. Dillard, and G. Brewer. 1999. Regulation of AUF1 expression via conserved alternatively spliced elements in the 3' untranslated region. *Mol.Cell Biol.* 19:4056-4064.
409. Wilson, J. W., D. M. Pritchard, J. A. Hickman, and C. S. Potten. 1998. Radiation-induced p53 and p21WAF-1/CIP1 expression in the murine intestinal epithelium: apoptosis and cell cycle arrest. *Am.J.Pathol.* 153:899-909.
410. Winter, M., D. Milne, S. Dias, R. Kulikov, U. Knippschild, C. Blattner, and D. Meek. 2004. Protein kinase CK1delta phosphorylates key sites in the acidic domain of murine double-minute clone 2 protein (MDM2) that regulate p53 turnover. *Biochemistry* 43:16356-16364.
411. Won, K. A. and S. I. Reed. 1996. Activation of cyclin E/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *EMBO J.* 15:4182-4193.
412. Wood, K. A., B. Dipasquale, and R. J. Youle. 1993. In situ labeling of granule cells for apoptosis-associated DNA fragmentation reveals different mechanisms of cell loss in developing cerebellum. *Neuron* 11:621-632.
413. Wood, K. A. and R. J. Youle. 1995. The role of free radicals and p53 in neuron apoptosis in vivo. *J.Neurosci.* 15:5851-5857.
414. Woodgett, J. R. 2001. Judging a protein by more than its name: GSK-3. *Sci.STKE.* 2001:RE12.
415. Woods, D. B. and K. H. Vousden. 2001. Regulation of p53 function. *Exp.Cell Res.* 264:56-66.
416. Woronicz, J. D., A. Lina, B. J. Calnan, S. Szychowski, L. Cheng, and A. Winoto. 1995. Regulation of the Nur77 orphan steroid receptor in activation-induced apoptosis. *Mol.Cell Biol.* 15:6364-6376.

417. Wouters, B. G., A. J. Giaccia, N. C. Denko, and J. M. Brown. 1997. Loss of p21Waf1/Cip1 sensitizes tumors to radiation by an apoptosis-independent mechanism. *Cancer Res.* 57:4703-4706.
418. Wu, G. S., T. F. Burns, E. R. McDonald, III, W. Jiang, R. Meng, I. D. Krantz, G. Kao, D. D. Gan, J. Y. Zhou, R. Muschel, S. R. Hamilton, N. B. Spinner, S. Markowitz, G. Wu, and W. S. El Deiry. 1997. KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat.Genet.* 17:141-143.
419. Wu, L., D. Wells, J. Tay, D. Mendis, M. A. Abbott, A. Barnitt, E. Quinlan, A. Heynen, J. R. Fallon, and J. D. Richter. 1998. CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation and the regulation of experience-dependent translation of alpha-CaMKII mRNA at synapses. *Neuron* 21:1129-1139.
420. Xiong, Y., G. J. Hannon, H. Zhang, D. Casso, R. Kobayashi, and D. Beach. 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366:701-704.
421. Yang, A., M. Kaghad, Y. Wang, E. Gillett, M. D. Fleming, V. Dotsch, N. C. Andrews, D. Caput, and F. McKeon. 1998. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol.Cell* 2:305-316.
422. Yonish-Rouach, E., D. Resnitzky, J. Lotem, L. Sachs, A. Kimchi, and M. Oren. 1991. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352:345-347.
423. Youn, H. D., L. Sun, R. Prywes, and J. O. Liu. 1999. Apoptosis of T cells mediated by Ca²⁺-induced release of the transcription factor MEF2. *Science* 286:790-793.
424. Zhang, T., V. Kruys, G. Huez, and C. Gueydan. 2002. AU-rich element-mediated translational control: complexity and multiple activities of trans-activating factors. *Biochem.Soc.Trans.* 30:952-958.
425. Zhang, W., B. J. Wagner, K. Ehrenman, A. W. Schaefer, C. T. DeMaria, D. Crater, K. DeHaven, L. Long, and G. Brewer. 1993. Purification, characterization, and cDNA cloning of an AU-rich element RNA-binding protein, AUF1. *Mol.Cell Biol.* 13:7652-7665.
426. Zhou, J., J. Ahn, S. H. Wilson, and C. Prives. 2001. A role for p53 in base excision repair. *EMBO J.* 20:914-923.