

Tesis Doctoral

P19INK4D y su fosforilación secuencial son críticas para el mantenimiento de la integridad del genoma

Marazita, Mariela C.

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Marazita, Mariela C.. (2010). P19INK4D y su fosforilación secuencial son críticas para el mantenimiento de la integridad del genoma. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Marazita, Mariela C.. "P19INK4D y su fosforilación secuencial son críticas para el mantenimiento de la integridad del genoma". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

**P19INK4D, ACTIVADA POR FOSFORILACIÓN
SECUENCIAL, ES CRÍTICA EN EL MANTENIMIENTO DE
LA INTEGRIDAD DEL GENOMA**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área Química Biológica

Mariela C. Marazita

Directores de Tesis: Dr. Eduardo Tomás Cánepa

Dr. Omar Pedro Pignataro

Consejero de Estudios: Dr. Eduardo Tomás Cánepa

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de
Química Biológica, FCEyN-UBA.

Laboratorio de Endocrinología Molecular y
Transducción de Señales, IByME-CONICET.

Buenos Aires, 2010

Resumen

Las proteínas INK4 (p16INK4a, p15INK4b, p18INK4c, y p19INK4d) componen una familia de inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) que funcionan en la fase G1 bloqueando la actividad de las quinasas CDK4 y CDK6. Mientras que comparten similitudes en sus estructuras formadas por repeticiones de motivos ankirina, estas proteínas difieren en sus patrones de expresión durante el desarrollo y en el adulto. Más allá de la aparente redundancia de su función en el control del ciclo celular, algunos de sus miembros han sido involucrados en distintos procesos tales como diferenciación, senescencia y supresión tumoral.

En este trabajo demostramos que p19INK4d es inducido por radiación UV en diferentes tipos celulares (células de Leydig MA-10, cultivos primarios de células de Leydig, BHK-21 y WI-38) y que la inducción es específica de este miembro de la familia. Planteamos que la inducción podría implicar una posible participación de p19INK4d en la reparación del ADN. Mediante diversas estrategias, establecimos que p19INK4d efectivamente tiene una función en este proceso. Además, frente a daño genotóxico la disminución en los niveles de p19INK4d aumentó el número de aberraciones cromosómicas, concluyendo que la actividad de p19INK4d afecta el mantenimiento de la integridad del genoma. Sumado a esto, las células con niveles reducidos de p19INK4d resultaron con menor capacidad de sobrevivir al tratamiento con radiación UV.

En respuesta al daño al ADN se encienden una serie de cascadas de señales que involucran diversas proteínas quinasas. Estas quinasas activan a su vez diferentes sustratos efectores de la respuesta conduciendo a la reparación, o no, del daño. Habiendo descrito una función de p19 en este proceso el siguiente objetivo consistió en estudiar si p19 formaba parte de este grupo de proteínas efectoras fosforiladas frente al daño. Encontramos que p19 es fosforilada por agentes que inducen diferentes tipos de daño (radiación UV, péptido β -amiloide y cisplatino). Identificamos dos sitios de fosforilación, serina 76 y treonina 141, los cuales son fosforilados en forma secuencial. Los resultados señalan a CDK2 y CDK5 como responsables de la fosforilación en serina 76 y a PKA en treonina 141. La fosforilación de ambos sitios ocurre en el citoplasma y la serina 76 es necesaria para la translocación de p19 al núcleo en esta respuesta.

Evaluamos luego la relevancia fisiológica de la fosforilación en estos sitios. Encontramos que tanto la serina 76 como la treonina 141 son estrictamente necesarias para la función de p19 en la reparación del ADN. Sin embargo, mutantes

en estos sitios incapaces de ser fosforiladas, mantienen la misma capacidad de inhibir la proliferación del ciclo celular cuando son sobreexpresadas. Esto señala que existe una independencia en la función de reparación respecto de la función inhibitoria de CDK4/CDK6.

Por último, iniciamos el estudio referido a las posibles proteínas que interactúan con p19INK4d relacionadas a la función de reparación del ADN. Describimos seis interactores encontrados por análisis de doble híbrido en levaduras que resultan de particular interés porque presentan funciones en procesos comunes a p19INK4d. Estos posibles interactores participan en la reparación del ADN, en la remodelación de la cromatina y en la regulación de factores de transcripción del ciclo celular y la apoptosis.

En vista de la participación de p19INK4d en respuesta a diversos agentes genotóxicos, que activan distintos mecanismos de reparación, postulamos que p19INK4d actuaría en la reparación del ADN específicamente en una etapa temprana de la respuesta celular al daño al ADN. El análisis de los potenciales interactores de p19INK4d, luego de la injuria genotóxica, permite sugerir la participación de esta proteína en los complejos remodeladores de la cromatina necesarios para permitir el acceso de las maquinarias de reparación en los sitios de daño.

Palabras clave: Ciclo Celular - p19INK4d – Respuesta al Daño al ADN – Reparación del ADN – Fosforilación.

Abstract

INK4 proteins are members of a family of cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors that function in G1 to block the activity of CDK4 and CDK6. While they share clear structural similarities, numerous studies have shown that INK4 proteins differ in their expression patterns during development and in the adult, and have differing roles in differentiation, senescence and tumor suppression.

We demonstrated that p19INK4d is induced in response to UV radiation in different cell types (Leydig MA-10 cell line, primary Leydig cell culture, BHK-21 y WI-38) and that this induction is specific of this family member. We hypothesized that this fact could be related to a role of p19INK4d in DNA repair. Taking advantage of diverse strategies, we found that p19INK4d effectively participates in this process. Adding to this, diminished p19INK4d levels when cells are exposed to genotoxics leads to an increase in the number of chromosomal aberrations. From these facts we concluded that p19INK4d influences the maintenance of genome integrity. Furthermore, cells with reduced p19 expression resulted in a significant decrease of the survival rate upon UV damage.

In DNA damage response different pathways are triggered involving the activity of protein kinases. These kinases in turn activate diverse substrates that act as effectors of the response leading or not to DNA repair. Having described a function of p19INK4d in this process, the next aim led the study to analyze whether p19INK4d is part of the effector proteins phosphorylated after DNA damage. We found out that p19 is phosphorylated by treatment with agents which induce different types of DNA damage (UV light, β -amyloid peptide and cisplatin). We identified two phosphorylation sites, serine 76 and threonine 141, which are sequentially phosphorylated. Our results pointed out CDK2 and CDK5 as responsible kinases to act on serine 76 and PKA as the one acting on threonine 141. Both sites are phosphorylated in the cytoplasmic space but only serine 76 is required for p19INK4d translocation to the nucleus in this response.

We investigate the physiological relevance of the phosphorylation process in these sites. We showed that serine 76 and threonine 141 are strictly necessary for p19 function in DNA repair. However, those mutants of p19 not able to be phosphorylated have full capacity for inhibiting cell proliferation when they are overexpressed. This fact indicates the independence of p19INK4d functions.

Lastly, we began the study related to potential proteins interacting with p19INK4d linked to DNA repair. We described six interactors found by a yeast two

hybrid screening which appear particularly interesting because they have functions in common processes to p19INK4d. These interactors participate in processes such as: DNA repair, chromatin remodelling and regulation of transcription factors of the cell cycle and apoptosis.

Taking into account p19INK4d participation in response to diverse genotoxic agents which activate different DNA repair mechanisms, we finally raised the hypothesis that p19 would be taking part in an early step in DNA damage response, specifically in DNA repair. The analysis of potential p19INK4d interactors, after genotoxic injury, suggests that this protein could play a role as a member of chromatin - remodeling complexes necessary for the accessibility of DNA repair machineries to DNA damaged sites.

Keywords: Cell Cycle - p19INK4d - DNA Damage Response - DNA repair - Phosphorylation

- El primer capítulo de este trabajo ha dado lugar a la publicación del siguiente artículo:

DNA Repair 6 (2007) 626–638

Cell cycle inhibitor, p19INK4d, promotes cell survival and decreases chromosomal aberrations after genotoxic insult due to enhanced DNA repair

M. E. Scassa* , M. C. Marazita* , J. M. Ceruti, A. L. Carcagno, P. F. Sirkin, M. González-Cid, O. P. Pignataro, E. T. Cánepa.

- * Estos autores colaboraron de forma igual en este trabajo.

- Se encuentra en preparación el siguiente manuscrito titulado:

p19INK4D DNA repair function relays on sequential phosphorylation

M. C. Marazita, M. F. Ogara, J.M. Ceruti, A. C. Carcagno, S. V. Sonzogni, N. Duseti, M. Martí, O. Pignataro, Eduardo T. Cánepa

Abreviaturas	1
INTRODUCCIÓN	2
1. Ciclo Celular	3
1.1 Regulación del ciclo celular	3
1.1.1 Quinasas dependientes de ciclinas (CDKs)	4
1.1.2 Ciclinas	6
1.1.3 Inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CKIs)	8
1.2 Familia INK4.....	8
1.2.1 Función de las proteínas INK4	10
2. Mantenimiento de la integridad del genoma	12
2.1 Agentes genotóxicos.....	13
2.1.1 Radiación UV	13
2.1.2 Cis-platino.....	14
2.1.3 Péptido β -amiloide.....	14
3. Puntos de control de daño	14
3.1 Participantes en la respuesta al daño al ADN.....	16
3.1.1 Sensores.....	16
3.1.2 Mediadores.....	17
3.1.3 Transductores.....	17
3.1.4 Efectores.....	18
3.2 Checkpoints G1, S y G2	18
3.2.1 <i>Checkpoint</i> G1	19
3.2.2 <i>Checkpoint</i> S	19
3.2.3 <i>Checkpoint</i> G2	20
4. Sistemas de Reparación	21
4.1 Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER)	21
4.2 Reparación por Escisión de Base (BER)	23
4.3 Mismatch Repair (MMR)	23
4.4 Mecanismo de reparación por Recombinación Homóloga (HR)	24
4.5 Mecanismo de reparación por unión de extremos no homólogos(NHEJ) 25	
OBJETIVOS e HIPÓTESIS	29
Objetivo General	30
Objetivos Específicos.....	30
Hipótesis	31
RESULTADOS	32
Capítulo 1: participación de p19INK4d en la reparación del ADN	33

1.1	p19INK4d se expresa en forma periódica en el ciclo celular en células de Leydig MA-10	33
1.2	La expresión de p19INK4d es inducida por radiación UV	35
1.3	p19 es la única INK4 cuya expresión es inducida por radiación UV	37
1.4	p19 participa en la reparación del ADN	38
1.4.1	Ensayo de reparación del ADN por HCR.....	38
1.4.2	Estudio de la capacidad de reparación del ADN por UDS.....	42
1.4.3	Análisis de reparación del ADN por remoción de CPDs.....	44
1.4.4	Ensayo del Cometa	46
1.5	p19 confiere mayor resistencia a la irradiación por UV	48
1.6	La deficiencia de p19 aumenta la frecuencia de aberraciones cromosómicas.....	53
1.7	p19 participa de la reparación del ADN en forma independiente de su función inhibitoria del ciclo celular	56
Capítulo 2: Mecanismo de activación de p19INK4d frente a daño genotóxico.		59
2.1	p19 es fosforilada en respuesta al daño genotóxico.....	60
2.2	Predicción de sitios de fosforilación en p19	62
2.3	Los sitios serina 76 y treonina 141 son críticos para la fosforilación de p19	65
2.4	Predicción de quinasas responsables de la fosforilación de p19.....	66
2.5	PKA y miembros de la familia CDK están involucrados en la fosforilación de p19	67
2.6	p19 es fosforilada en forma secuencial.....	68
2.7	Simulación de fosforilación secuencial en p19	70
2.8	CDK2 está involucrada en la fosforilación de p19.....	73
2.9	CDK2 y CDK5 tienen la capacidad de fosforilar en forma directa a p19 76	
2.10	PKA puede fosforilar en forma directa a p19.....	79
2.11	PKA interacciona con p19 <i>in vivo</i>	82
2.12	La fosforilación de p19 luego de daño genotóxico es iniciada en el citoplasma	83
2.13	La serina en la posición 76 es necesaria para la translocación nuclear de p19	84
Capítulo 3: Relevancia fisiológica del proceso de fosforilación de p19INK4d en respuesta a genotóxicos.....		88
3.1	Análisis de la conservación de los sitios serina 76 y treonina 141 entre los miembros de la familia INK4	88
3.2	Serina 76 y Treonina 141 son necesarias para la función de p19 en la reparación del ADN	90

3.3 La sobreexpresión de p19 disminuye la apoptosis inducida por genotóxicos	92
3.4 La fosforilación de p19 es necesaria en la resistencia que ejerce p19 contra la apoptosis.	93
3.5 La fosforilación de p19 no está involucrada en su función inhibitoria del ciclo celular.....	95
3.6 Las mutantes de p19 que simulan el estado fosforilado de la proteína tienen igual capacidad de reparar el ADN que p19 salvaje.....	96
3.7 La serina 76 y la treonina 141 son los únicos sitios de fosforilación en p19 en respuesta a daño.....	99
3.8 Ambos sitios, serina 76 y treonina 141, son fosforilados en el citoplasma luego de daño al ADN	100
Capítulo 4: Interactores de p19	102
4.1 Búsqueda de interactores de p19 por ensayo de doble híbrido	102
4.1.1 Descripción del sistema	102
4.1.2 Determinación de interactores de p19	103
4.1.3 Análisis de los interactores.....	104
Conclusiones	112
DISCUSIÓN	113
1. Función de p19 en la respuesta al daño al ADN y en la supervivencia celular.....	114
1.1 Inducción de p19 en respuesta a daño por UV.....	114
1.2 p19 en la respuesta al daño	115
1.3 p19 en la supervivencia celular y en el mantenimiento de la integridad del genoma	117
1.4 Independencia de funciones.....	118
2. Daño al ADN y fosforilación de p19	119
2.1 p19 resulta fosforilada en respuesta a daño	119
2.2 ¿En qué sitios es fosforilada p19 ?	120
2.3 ¿Cuáles son las quinasas involucradas en el proceso de fosforilación?	121
2.4 Hipótesis de la fosforilación secuencial	124
2.5 ¿En qué compartimento subcelular ocurre la fosforilación de p19? ...	125
2.6 ¿Cuál es la relevancia fisiológica de la fosforilación?	126
3. Interactores de p19 ligados al rol de reparación del ADN	128
MATERIALES Y MÉTODOS	131
Cultivo de Líneas Celulares	132
Arresto del ciclo celular.	133

Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo.	133
Análisis de ARN por Northern blot.	133
Marcación de sondas	134
Análisis de proteínas por Western blot	136
Agentes genotóxicos	138
Inhibidores de quinasas	139
Preparación de plásmidos	139
Análisis de las preparaciones plasmídicas.	140
Subclonados y Mutagénesis Dirigida	141
Subclonado del cADN de p19INK4d	141
Construcción de mutantes p19S66A, P19S76A, p19T141A, p19S76E.....	141
Construcción de mutantes p19ANKless, p19S13A, p19T141A, p19S76T141A, p19S76T141E	143
Transfección transitoria de células y selección.	144
Actividad de la enzima caspasa-3	145
Generación de líneas celulares estables para p19INK4d	146
Síntesis de ADN no programada (UDS, <i>Unscheduled ADN Synthesis</i>).	146
Ensayo de reactivación en la célula huésped (HCR)	147
Incorporación de ³H-timidina	149
Ensayo de MTT: estimación de viabilidad celular	149
Ensayo clonogénico.	149
Ensayo del cometa "Comet Assay"	150
Análisis de aberraciones cromosómicas	151
Fosforilación <i>in vitro</i>	153
Ensayo de fosforilación del péptido de p19 por PKA	153
Ensayo de fosforilación de GST-p19 por PKA.....	154
Ensayo de fosforilación del péptido de p19 por CDK2 y CDK5	155
Ensayo de fosforilación de GST-p19 por CDK2 y CDK5	155
Inmunoprecipitación de CDK2 ó CDK5	156
Disminución de los niveles de las quinasas CDK1 y CDK2	156
Interacción de p19 y PKA <i>in vivo</i>	157
Inducción y purificación de GST-p19	157
Técnica de Doble Híbrido en levaduras	158
Análisis de estructura y simulación de fosforilación de p19	158
REFERENCIAS	160

Abreviaturas

ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia del ARN mensajero

ASCDK1: oligonucleótido antisentido para CDK1

ASCDK2: oligonucleótido antisentido para CDK2

ATM: *ataxia-telangiectasia mutated*

ATR: *ATM and RAD3-related*

BER: mecanismo de reparación por excisión de bases

CAT: cloramfenicol acetil transferasa

CDKs: quinasas dependientes de ciclinas

CKI s: proteínas inhibidoras de CDK

CPD: dímeros de timidina tipo ciclobutano

DDR: respuesta al daño al ADN

DSBs: roturas del ADN de doble cadena

GGR: reparación global del genoma

HCR: ensayo de reparación Host Cell Reactivation

HDACs: deacetilasas de histonas

HR: mecanismo de reparación por recombinación homóloga

INK4: inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas

MA-10p19S: línea celular con expresión inducible de p19

MA-10p19AS: línea celular con expresión inducibles p19 antisentido

NER: mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos

p-H1: péptido de histona H1 conteniendo una secuencia consenso para PKA

PKA: proteína quinasa A

p-S76: péptido de p19 conteniendo el sitio serina 76

p-T141: péptido de p19 conteniendo el sitio treonina 141

p19: p19INK4d

ssADN: cadena simple de ADN

TCR: reparación acoplada a la transcripción

UDS: síntesis de ADN no programada

UV: radiación ultravioleta

INTRODUCCIÓN

1. Ciclo Celular

La función principal del ciclo celular es duplicar con exactitud el ADN de los cromosomas y luego dividir las copias en dos células hijas idénticas. El ciclo celular está dividido en cuatro fases: G1, S, G2 y M. Durante dos de estas fases, las células ejecutan los dos eventos más importantes de la división celular: la generación de una copia confiable de su material genético (fase S) y la distribución de todos los componentes celulares entre dos células hijas idénticas (fase M). Las otras dos fases del ciclo (G1 y G2) representan períodos “gap” durante los cuales las células se preparan para completar con éxito las fases S y M, respectivamente (Malumbres and Barbacid, 2001); (Norbury and Nurse, 1992).

Las células en cultivo, al iniciar una nueva ronda de división, pasan por un período de dependencia de factores mitogénicos necesarios para promover la división celular. A medida que el ciclo progresa esta dependencia desaparece y las células se encuentran comprometidas a concluir el ciclo iniciado independientemente de la presencia de factores externos (Pardee, 1974; Pardee, 1989). Esta transición se denomina Punto de Restricción o punto R y es comúnmente utilizado para dividir las fases G1 temprana y G1 tardía del ciclo celular (Malumbres and Barbacid, 2001). El punto R determina una situación de no-retorno, si los mitógenos son removidos del medio antes de este momento las células retornan al estado de quiescencia o G0, si la remoción ocurre una vez alcanzado este punto la progresión del ciclo celular no se ve afectada (Kondo et al., 2001). En el estado G0, las células detienen la división celular aunque mantienen un metabolismo activo y, ante un estímulo adecuado, abandonan el estado G0 y entran a la fase G1 reiniciando el ciclo proliferativo (Kondo et al., 1999).

El ciclo celular mitótico se modifica hacia un ciclo meiótico durante la formación de las gametas, llevando a la reducción del número de cromosomas, esencial para la reproducción sexual, y al aumento en la variabilidad genética, sustrato de la evolución por selección natural y por deriva génica (Nurse, 2000). Por lo tanto, el ciclo celular juega un rol central en la concreción y el desarrollo de toda la vida, y asegura su continuidad a través de las generaciones.

1.1 Regulación del ciclo celular

El pasaje de una a otra fase del ciclo se encuentra estrictamente controlado por una gran cantidad de proteínas involucradas en regular tanto positiva como negativamente la progresión del ciclo celular. El control riguroso que ejercen o es

ejercido sobre estos factores evita la iniciación de la fase siguiente sin que la anterior halla sido completada satisfactoriamente (Bulavin et al. 2002; Hartwell and Weinert, 1989), contribuyendo a la fidelidad en el mantenimiento y en la transferencia de la información genética (Zhou and Ellege, 2000).

Como factores principales en la regulación se encuentran: las quinasas dependientes de ciclinas (**CDKs**) que fosforilan a diversas proteínas en serinas y treoninas, las ciclinas que regulan la actividad quinasas de las CDKs, y las proteínas inhibidoras de CDKs (**CKIs**) (**Figura III**). Estas proteínas integran el flujo de información proveniente desde el exterior celular para dirigir el inicio del ciclo celular y la progresión a través de todas sus fases.

1.1.1 Quinasas dependientes de ciclinas (CDKs)

Las quinasas dependientes de ciclinas son un grupo de serina treonina quinasas que forman complejos activos heterodiméricos luego de unirse a las ciclinas, sus subunidades regulatorias (Morgan, 1997; Sherr, 2000). Estas holoenzimas, complejos CDK-ciclina, catalizan una gran variedad de reacciones, fosforilando diversos sustratos que permiten el pasaje de las células a través de las distintas fases del ciclo celular (Herrup and Yang, 2007).

En humanos se reportaron numerosos *loci* que codifican para CDKs y ciclinas (13 y 25 loci respectivamente) (Malumbres and Barbacid, 2005). Sin embargo, sólo un grupo de complejos CDK-ciclinas está directamente relacionado en la conducción del ciclo celular. Este grupo incluye tres CDKs de interfase (CDK2, CDK4 y CDK6), una CDK de fase M (CDK1, también conocida como *cdc2* por *cell division control protein 2*) y 10 ciclinas que pertenecen a 4 clases diferentes (ciclinas de tipo A, B, D y E) (Malumbres and Barbacid, 2009). CDK4 y de CDK6 están involucradas en la fase G1 temprana, mientras que CDK2 es requerida para completar G1 e iniciar S (**Figura I y II**). CDK4 y CDK6 forman complejos activos con las ciclinas de tipo D (ciclina D1, D2 y D3) (Attwooll et al., 2004), mientras que CDK2 forma complejos activos con ciclina E y ciclina A (Sherr, 2000) y CDK1 con ciclina A y ciclina B (Evans et al., 1983; Ewen et al., 1993; Weinberg, 1995).

Evolutivamente, estas quinasas están muy relacionadas y han resistido la diferenciación funcional, excepto por los distintos patrones de activación que presentan (Meyerson and Harlow, 1994). La actividad enzimática de estas proteínas CDKs se encuentra regulada por al menos tres mecanismos diferentes. El primero consta de su unión a ciclinas y su consecuente activación. El segundo, por acción de

los inhibidores de quinasas dependiente de ciclinas (CKIs). En el tercer mecanismo, la regulación se produce por procesos de fosforilación en residuos treonina y tirosina, los cuales regulan la actividad catalítica de la enzima tanto positivamente (cuando actúa el complejo CDK7-ciclina H, también conocido como CAK; *CDK activating kinase*) (Malumbres and Barbacid, 2001), como negativamente (quinasas Wee1 y MYT1). A su vez, esta inhibición es retirada cuando las fosfatasa CDC25 (CDC25A, CDC25B o CDC25C) defosforilan estos residuos, disparando la entrada en mitosis (Trimarchi and Lees, 2002).

Los principales sustratos de CDK4/6 y CDK2 en la progresión de la fase G1 son los miembros de la familia de proteínas de retinoblastoma (Rb, p107 y p130). Estas moléculas funcionan como sitios de anclaje para una serie de proteínas que deben ser fuertemente reguladas durante el ciclo celular. Por ejemplo, la proteína Rb se une a los factores de transcripción de la familia E2F, asegurando que estos permanezcan inactivos durante las fases M y G0. Además, los complejos Rb-E2F participan en un mecanismo de represión activa sobre algunos promotores: este proceso involucra otras familias de proteínas, como las deacetilasas de histonas (HDACs), complejos remodeladores de la cromatina SWI/SNF y metiltransferasas de histonas como SUV39H1. La actividad de las proteínas Rb es modulada mediante fosforilación secuencial por los complejos CDK4/6-ciclina D y CDK2-ciclina E. Rb también puede ser regulada por acetilación mediada por histonas acetilasas asociadas a p300/CBP. Estas acetilasas están bajo el control del ciclo celular e impiden la eficiente fosforilación de Rb por el complejo CDK2-ciclina E. Las proteínas Rb hiperfosforiladas liberan las moléculas que se unen a sus isoformas hipofosforiladas. Esta "liberación" les permite llevar a cabo sus roles específicos en el ciclo celular (Malumbres and Barbacid, 2001).

En las células eucariotas se ha registrado que, durante la fase G1, los niveles de actividad CDK neta son relativamente bajos. Sin embargo, esta actividad aumenta progresivamente mientras las células avanzan en el ciclo de división. Inicialmente presenta un pico y luego decae rápidamente durante la mitosis (Morgan, 1997). El nivel reducido de actividad CDK, observado durante la fase G1, es requerido para la formación de los complejos de preiniciación en los orígenes de replicación del ADN cromosómico (Massague, 2004).

Luego, la entrada y la progresión a través de la fase S y la entrada en mitosis pueden proceder únicamente en la presencia de una actividad enzimática más robusta (Sherr and Roberts, 2004). Por lo tanto, los reguladores de CDKs, al modular su actividad, pueden controlar el destino del ciclo celular.

1.1.2 Ciclinas

Las ciclinas constituyen una familia de proteínas que son sintetizadas y degradadas en momentos específicos del ciclo celular. Los miembros de esta familia comparten cierto grado de similitud en cuanto a su composición aminoacídica y son definidas por una región común denominada “*cyclin box*” que permite la unión a las CDKs y su activación (Peeper et al., 1993; Pines and Hunter, 1989). Hay dos clases principales de ciclinas: las ciclinas G1, que se unen a CDKs durante G1 y son necesarias para el inicio de la fase S, y las ciclinas mitóticas, que se unen a CDKs durante la fase G2, siendo necesarias para la entrada en mitosis.

Existen dos tipos de ciclinas de fase G1: las de tipo D (D1, D2 y D3) y las de tipo E (E1 y E2). Estas ciclinas poseen una vida media corta, siendo sus niveles regulados a nivel transcripcional y por degradación. El ensamblado con sus respectivas CDKs (CDK 4 ó 6, y CDK2, respectivamente) se produce a medida que la célula va progresando en la fase G1. Por otro lado, se conocen dos tipos de ciclinas mitóticas denominadas A y B. La expresión de la ciclina A comienza en la fase S, la de tipo B lo hace en la fase G2. Durante la mitosis ambas ciclinas son degradadas. CDK2 es activada secuencialmente por ciclinas de tipo E durante la transición G1/S, y las ciclinas de tipo A (ciclina A1 y A2) durante la fase S. Luego, la quinasa principal es CDK1, activada primero por ciclinas A y más tarde por ciclinas de tipo B (B1 y B2) (Minshull et al., 1990; Pines and Hunter, 1990).

Como mencionamos anteriormente, los niveles de ciclinas no son constantes a lo largo del ciclo celular, sino que se ven sometidas a un proceso de síntesis y degradación, esta última por el sistema de ubiquitinación-proteasoma, dentro de cada período. Este acontecimiento resulta fundamental, ya que, de esta manera, se logra la regulación de la forma activa de las CDKs para así poder fosforilar a sus sustratos, generalmente relacionados con el inicio o la regulación de sucesos importantes dentro del ciclo celular (Murray, 2004). Las ciclinas poseen la capacidad de dirigir a las CDKs al núcleo, dado que, a diferencia de estas últimas, contienen señales de localización nuclear.

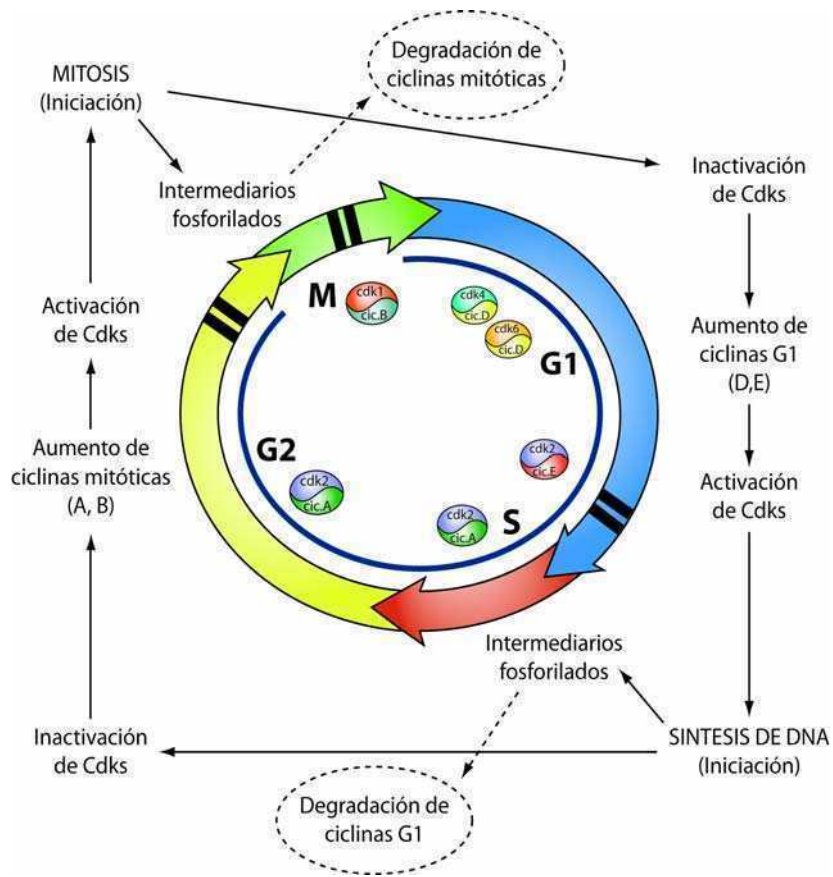


Figura I. Regulación de los factores intracelulares (CDK y ciclinas) involucrados en el control del ciclo celular. Modificado de Domenico Coppola.

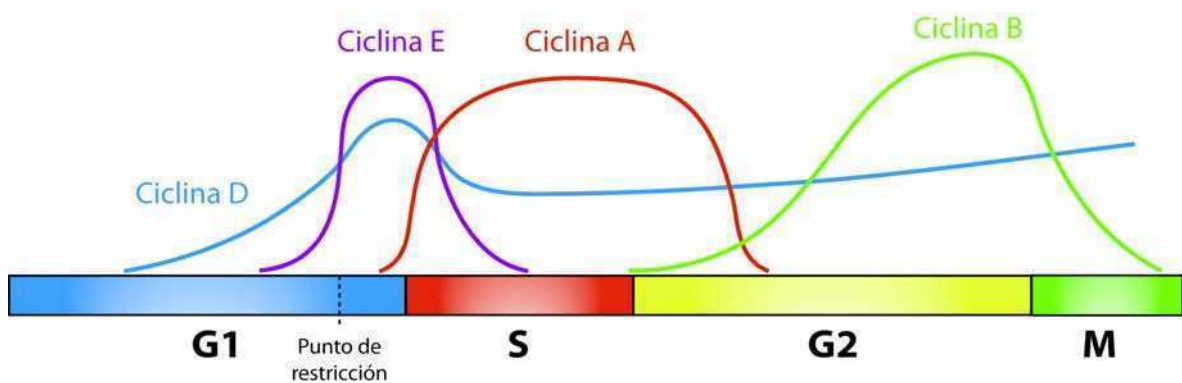


Figura II. Niveles proteicos de las diferentes ciclinas a lo largo del ciclo celular

1.1.3 Inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CKI s)

En mamíferos existen 2 familias de proteínas que actúan como inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CKIs) (Hirama and Koeffler, 1995; Ortega et al., 2002; Sherr and Roberts, 1999; Trimarchi and Lees, 2002) (**Figura III**). La familia de las INK4 (por *inhibitors of CDK4*) compuesta por las proteínas p16INK4a, p15INK4b, p18INK4c y p19INK4d; y la familia de las Cip/Kip, formada por p21 (ó Cip1, *CDK2 interacting protein*), p27 (ó Kip1, *kinase inhibiting protein 1*) y p57 (ó Kip 2) (**Figura I**). Las Cip/Kip tienen el potencial necesario para inhibir a diferentes CDKs, principalmente CDK2-ciclina E/A y CDK1- ciclina B (Hengst and Reed, 1998; Nakayama and Nakayama, 1998). Las 4 proteínas que conforman al grupo INK4 tienen la capacidad de unirse a CDK4/6, inhibiendo la unión de la ciclina D e impidiendo su activación.

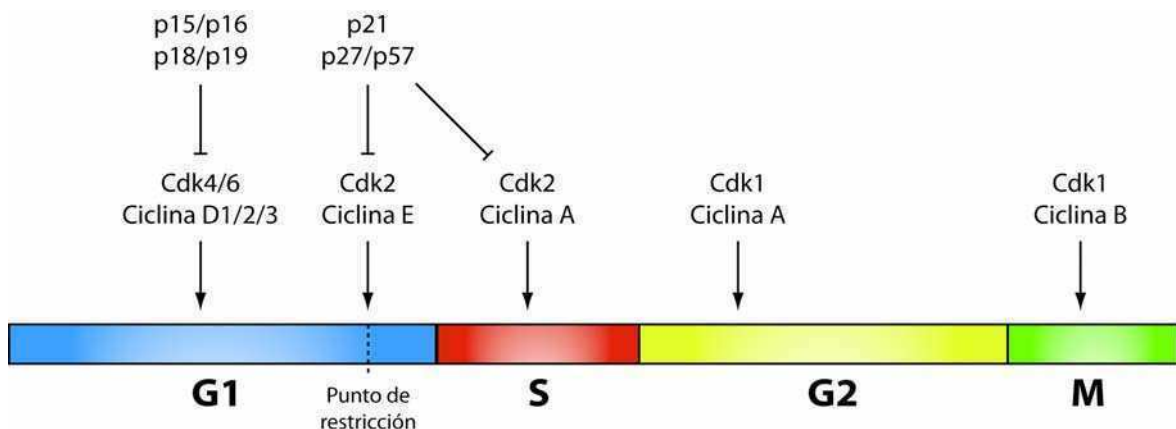


Figura III. Regulación de los complejos ciclina – CDKs a lo largo del ciclo celular. Modificado de Trimarchi y Lees, 2002.

1.2 Familia INK4

Las proteínas INK4 componen una de las dos familias de inhibidores de quinasas dependientes de ciclina. Han sido identificados cuatro miembros: p16INK4a (p16), p15INK4b (p15), p18INK4c (p18) y p19INK4d (p19), nombrados de acuerdo a su masa y en el orden que fueron descubiertos (Chan et al., 1995; Guan et al., 1996; Hannon and Beach, 1994; Hirai et al., 1995; Serrano et al., 1993). Cada uno es codificado por un único gen, los cuales mapean en los siguientes cromosomas:

p16INK4a y p15INK4b unidos en tándem en 9p21, p18INK4c en 1p32 y p19INK4d en 19p13.

Las proteínas INK4 tienen actividades similares, inhibiendo específicamente a las quinasas CDK4 y CDK6 (Serrano et al., 1993). Cuando son expresadas ectópicamente, arrestan a las células en G1, pero únicamente en presencia de proteínas pRb funcionales (Bruce et al., 2000). Las bases estructurales para la inhibición de la actividad quinasa de CDK4/6 por las proteínas INK4 están claramente establecidas (Brotherton et al., 1998; Ortega et al., 2002; Roussel, 1999). Las cuatro INK4 son estructuralmente similares dominando su estructura repeticiones de motivos ankirina. Los motivos ankirina contienen 32 aminoácidos y consisten en pares de α -hélices antiparalelas, conectadas entre sí por una serie de motivos horquilla ("*intervening hairpin motifs*") (Pavletich, 1999). Mientras que p16INK4a y p15INK4b están compuestas por cuatro motivos ankirina, p18INK4c y p19INK4d poseen cinco. Estos dominios estructurales están involucrados en la unión a la región no-catalítica de CDK4 y CDK6 opuesta al sitio de unión de ciclina D. La unión de las INK4 induce un cambio alostérico en CDK4/6, alterando el sitio de unión de las ciclinas D y reduciendo su afinidad por ATP (Pavletich, 1999).

Las cuatro INK4, además de compartir los motivos ankirina en la estructura, poseen un intrón que interrumpe la secuencia codificante de sus genes en la misma posición, lo que sugiere que todos los miembros de la familia han evolucionado desde un ancestro común (Ruas and Peters, 1998). En términos evolutivos, la redundancia de funciones en una familia proteica sólo es posible si los diferentes miembros poseen patrones de expresión diferente y/o si existen funciones características que han sido seleccionadas a lo largo de la historia evolutiva. Y este hecho se corrobora en los miembros de la familia INK4, para los cuales fue reportada la expresión diferencial en el desarrollo del ratón (Cunningham and Roussel, 2001). p18 y p19 son expresadas principalmente en el embrión, mientras que p16 y p15 son detectadas únicamente luego del nacimiento, en la mayoría de los tejidos.

Los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la expresión de las INK4 no están del todo definidos. Solamente la expresión de p19 es periódica a lo largo del ciclo celular (Hirai et al., 1995; Thullberg et al., 2000). Su expresión es baja en G0/G1 y tiene un máximo de expresión al final de G1 y en fase S. Luego, es rápidamente degradada por un mecanismo dependiente de ubiquitina/proteasoma de manera tal que, en G1 temprana, el nivel de p19 es bajo para facilitar el ensamble de los complejos CDK4/6 - ciclina D.

El mayor nivel de expresión proteica de p19INK4d (p19) ocurre en cerebro, testículos, bazo y timo. p19 está relativamente bien caracterizada en el sistema

nervioso central, donde es una de las proteínas INK4 mayoritarias. Es expresada tempranamente durante el desarrollo en el cerebro y allí su expresión es mantenida en la vida adulta.

1.2.1 Función de las proteínas INK4

El rol específico de cada miembro de la familia INK4 fue definido principalmente mediante la generación de cepas de ratones genéticamente modificados, deficientes en uno o varios miembros de esta familia génica (**Tabla 1**). Se ha demostrado que las proteínas p16INK4a, p15INK4b y p18INK4c son supresores tumorales (Cánepa et al, 2007). Ratones que expresan una versión inestable de p16 se desarrollan normalmente y sólo un pequeño porcentaje tienen linfomas de células-B luego de una latencia prolongada. Por otro lado, ratones homocigotos para una mutación que elimina el exón 1 α de p16 desarrollan una variedad de tumores a una tasa más elevada (25% de incidencia al año de edad) . Por lo tanto, p16 parece tener una actividad supresora tumoral moderada en ratones. En humanos, está ampliamente reportada la existencia de mutaciones puntuales que afectan específicamente la expresión de p16 y que están asociadas con la aparición de tumores (Cánepa et al, 2007).

El fenotipo de ratones nulos para p16 se asemeja al de animales mutantes para las otras INK4. Las distintas cepas desarrollan variados tipos de tumores, con baja incidencia y no presentan anormalidades significativas en el desarrollo. Ratones deficientes en proteínas INK4 son propensos a tener desórdenes hematopoiéticos. La alteración frecuente de p15 en tumores hematopoiéticos humanos y murinos, sugiere que la ausencia de esta proteína podría predisponer a la transformación maligna en estas células hematopoiéticas. p18 actúa como supresor tumoral o regula la homeostasis celular dependiendo del tejido y tipo celular (Franklin et al., 1998; Latres et al., 2000).

Ratones deficientes en p19 no desarrollan tumores u otro tipo de desórdenes proliferativos. Estos ratones a pesar de poseer atrofia testicular, son fértiles. Este fenotipo está asociado con un aumento en la apoptosis de las células germinales, un resultado que correlaciona con la elevada expresión de p19 en testículo (Zindy et al., 2000).

Estudios recientes realizados en ratones *knock out* para p19, demostraron que la falta de p19 incrementa la sensibilidad celular a la muerte apoptótica o autofágica y sugieren un posible rol para la inducción de p19INK4d en la quimioprevención

(Tavera-Mendoza et al., 2006a; Tavera-Mendoza et al., 2006b). Los ratones doble mutantes (p18; p19) presentan una incidencia tumoral similar a la de los animales deficientes en p18 parentales. Estos resultados en conjunto indicarían que p19 no es un supresor tumoral propiamente dicho.

Tabla I. Principales fenotipos para ratones knock out para CDK4 e INK4

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

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

2. Mantenimiento de la integridad del genoma

Para asegurar la supervivencia y la propagación del genoma a lo largo de las generaciones, las células eucariotas han desarrollado mecanismos de respuesta al daño o a estructuras anormales en el ADN a través de vías multifacéticas que coordinan la progresión del ciclo celular con la reparación del ADN, la remodelación de la cromatina, la modificación de programas transcripcionales, senescencia y la muerte celular (Lukas et al., 2004).

Mientras que, en organismos unicelulares, la respuesta a la presencia de lesiones en el ADN activa los puntos de control y los mecanismos de reparación, en los organismos multicelulares, cuando el daño es significativo, una célula puede derivar al inicio de un programa apoptótico (Hahn and Weinberg, 2002; Martin et al., 2003). A nivel celular, si el daño al ADN no es correctamente reparado, se produce inestabilidad genómica, senescencia o también apoptosis, la cual afecta al desarrollo de los organismos. La pérdida de la integridad genómica predispone al organismo a la inmunodeficiencia, desórdenes neurológicos y cáncer (O'Driscoll and Jeggo, 2002; Peterson and Cote, 2004). Es por esto que, a lo largo de la evolución, se han seleccionado mecanismos de respuesta al daño al ADN cada vez más eficientes, ya que una respuesta efectiva conferiría un mayor valor adaptativo a los organismos que la tuvieran. Mas allá de las fuentes exógenas de daño al ADN, una célula humana debe reparar más de 10.000 lesiones en el ADN por día generadas por acción de fuentes endógenas (Lindahl et al., 1993; Peterson and Cote, 2004). De hecho, se ha propuesto que la mayor parte de la maquinaria de reparación ha evolucionado para reparar este tipo de daño (Lindahl and Barnes, 2000; Lindahl and Wood, 1999). El daño al ADN activa mecanismos específicos de respuesta, dependiendo del tipo de lesión producida. Las lesiones son reparadas *in situ* o removidas y en general el ADN es restablecido a su secuencia original (Hoeijmakers, 2001).

Mientras que hasta el año 1996 todo el conocimiento relacionado con la respuesta al daño al ADN provenía del estudio en levaduras (Elledge, 1996), en los últimos años se han hecho numerosos avances en el estudio de la respuesta al daño al ADN en eucariotas superiores. Se ha visto que las vías regulatorias de esta respuesta son complejas y están altamente conservadas en mamíferos. La respuesta al daño al ADN comprende dos etapas fundamentales. Por un lado, la maquinaria de los puntos de control del ciclo celular arresta a las células en puntos específicos del ciclo para permitir la reparación de las lesiones antes de que sean convertidas en mutaciones permanentes. Por otro lado, el sistema de reparación propiamente dicho, que remueve o repara el daño (Hoeijmakers, 2001; Sandal, 2002).

En los últimos años, se ha delineado la hipótesis de que frente al daño en el ADN, además de las dos acciones mencionadas anteriormente, existe una respuesta integradora que involucra mecanismos de replicación, transcripción y dinámica de la estructura de la cromatina (Rouse and Jackson, 2002).

2.1 Agentes genotóxicos

Las lesiones en el ADN pueden deberse a tres causas principales: 1) causas endógenas: constituidas por productos del metabolismo celular normal, como las especies reactivas de oxígeno derivadas de la respiración oxidativa y de productos de la peroxidación de lípidos (Cadet et al., 1997); 2) causas exógenas: constituidas por agentes ambientales como: radiación ionizante, radiación ultravioleta y varios agentes genotóxicos que causan modificaciones en la estructura del ADN (Hoeijmakers, 2001); 3) otras causas: uniones químicas en el ADN que tienden a desintegrarse espontáneamente bajo condiciones fisiológicas. La hidrólisis de nucleótidos deja sitios abásicos no-instructivos. La deaminación de citosina, adenina, guanina o 5-metilcitosina convierte estas bases en las respectivas bases no codificantes uracilo, hipoxantina, xantina y timina (Lindahl et al., 1993).

Las lesiones provocadas en los modelos experimentales de esta tesis son las que se producen por causas exógenas: la radiación UVC y el cis-platino; y por causas endógenas: el péptido β -amiloide.

2.1.1 Radiación UV

La luz UV es una radiación electromagnética emitida por el sol (o por una fuente artificial), invisible al ojo humano. La radiación UV puede ser de tres tipos de acuerdo a la longitud de onda: UVA 315-380 nm, UVB 280-315 nm y UVC 190-280 nm. El contenido de energía de la radiación es inversamente proporcional a su longitud de onda, siendo UVC el componente más dañino de la luz UV. Las células contienen moléculas fotosensibles, los cromóforos, que luego de recibir fotones de radiación UV, elevan sus electrones hacia estado de energía superiores (Tyrrell, 1994). Debido a las estructuras de anillos aromáticos de sus bases, el ADN absorbe eficientemente las longitudes de onda mas cortas de la luz UV, y es el principal cromóforo para la radiación UVC (de Gruijl and Rebel, 2008). Los principales tipos de lesiones producidos por la radiación UV son los dímeros de timidina tipo ciclobutano (CPD) y los (6-4)-

fotoproductos (6-4PPs), los cuales entrecruzan bases adyacentes del ADN (Ravanat et al., 2001). Estas distorsiones en la hélice de ADN detienen la elongación de la ARN polimerasa, inhibiendo la expresión génica (Tornaletti and Hanawalt, 1999). Estas estructuras generan, además, el atascamiento de horquillas de replicación en estos sitios (Squires et al, 2004)

2.1.2 Cis-platino

El cis-platino es uno de los agentes antitumorales más potentes utilizado, con fines terapéuticos, para una amplia variedad de tumores sólidos. Su modo de acción citotóxico es mediado por su interacción con el ADN para formar aductos, principalmente de entrecruzamiento intracatenario, los cuales activan varias vías de transducción de señales, incluyendo aquellas que involucran a ATR, p53, p73 y MAPK (Siddik, 2003).

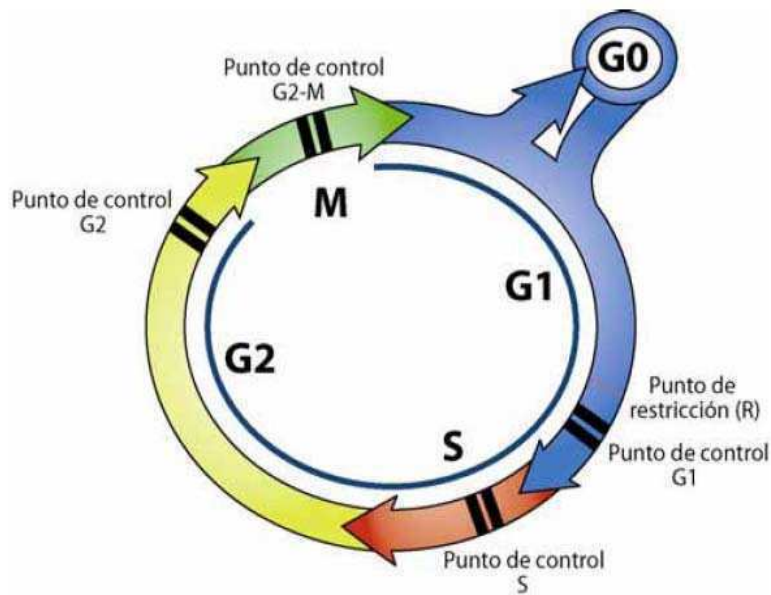
2.1.3 Péptido β -amiloide

El péptido β -amiloide es la molécula causante de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, y es el principal componente de las placas seniles (Kim et al., 2003). Los mecanismos involucrados en su acción neurotóxica no son totalmente conocidos, a pesar de que hay una gran variedad de evidencias que sugieren la participación del estrés oxidativo (Markesbery, 1997; Miranda et al., 2000; Smith et al., 2000). El estrés oxidativo incrementa los niveles de iones metálicos, los cuales aceleran la formación de radicales libres (Suh et al., 2000; Thompson et al., 1988), incrementa la oxidación de lípidos (Butterfield et al., 1994; Schippling et al., 2000), proteínas (Aksenov et al., 1997; Smith et al., 2000) y ADN (Lovell et al., 1999).

3. Puntos de control de daño

La respuesta al daño al ADN comprende una serie de vías de transducción de señales que integran diferentes procesos, como la progresión del ciclo celular, la replicación, la reparación del ADN, la senescencia y la muerte celular.

Para preservar la integridad del genoma, los organismos eucariotas poseen mecanismos de vigilancia, llamados puntos de control o *checkpoints*. Estos puntos de control detectan tanto lesiones en el ADN causadas por productos del metabolismo celular como por agentes genotóxicos externos. Los checkpoints son vías de transducción de señales conformadas por moléculas sensoras, mediadoras, transductoras y efectoras (Norbury and Zhivotovsky, 2004; Zhou and Elledge, 2000). Las proteínas sensoras detectan la presencia de daño o de estructuras aberrantes en el ADN y transforman estos estímulos en señales bioquímicas que modulan las funciones de sus proteínas blanco río abajo. Las proteínas mediadoras reciben estas señales y activan a los transductores de la señal. Estas proteínas, al activarse, amplifican las señales que reciben de los mediadores y las trasladan a los efectores, los cuales llevan a cabo una variedad de actividades que incluyen el arresto del ciclo celular en las fases G1, S o G2.



Modificado de Dehay y Kennedy, 2007.

Figura IV. Puntos de control (checkpoints) del ciclo celular.

Como principales reguladores de la respuesta al daño al ADN se han descrito las proteínas quinasas relacionadas a la fosfatidil - inositol 3 quinasa (PIKKs), entre ellas se incluyen: *ataxia-telangiectasia mutated* (ATM) y *ATM and RAD3-related* (ATR) (Khanna et al., 2001; Rotman and Shiloh, 1998; Niida and Nakanishi, 2006). ATM y ATR comparten varias similitudes bioquímicas y funcionales. Ambas son quinasas de alto peso molecular (350kDa y 301kDa para ATM y ATR, respectivamente) con alta

homología en sus secuencias y con una preferencia de fosforilación de serinas o treoninas seguidas de glutamina. Estas quinasas tienen como sustratos de fosforilación proteínas que promueven el arresto del ciclo celular, la reparación del ADN, la senescencia o la muerte celular. (Brown and Baltimore, 2000; Cortez et al., 2001; de Klein et al., 2000)

3.1 Participantes en la respuesta al daño al ADN

3.1.1 Sensores

La identidad de los sensores del daño al ADN no está aún completamente dilucidada. Sin embargo, varios estudios han demostrado que el complejo 9-1-1 (formado por RAD9, RAD1, HUS1) de la familia PCNA-*like* y RAD17 y RFC2-5 de la familia de proteínas RFC-*like* son factores esenciales para promover las señales de los *checkpoints* (Niida and Nakanishi, 2006). Una vez producido el daño, el complejo 9-1-1 es reclutado a estos sitios por el complejo RAD17. Luego, el complejo 9-1-1 facilitaría el reclutamiento de sustratos específicos al sitio de daño para ser fosforilados por las quinasas ATM y ATR (Abraham, 2001). Sumado a estos complejos, se ha descrito el complejo MRN (compuesto por MRE11/RAD50/NBS1) involucrado en el sensado de roturas de doble cadena (DSBs) (Petrini and Stracker, 2003). La interacción del complejo MRN con la lesión de tipo DSBs recluta ATM (Lukas et al., 2003).

El complejo MRN-ATM activa señales que culminan en el rearrreglo de la cromatina que contiene al daño. Estas señales incluyen la fosforilación de H2AX mediada por ATM, que luego permitirá el anclaje de proteínas mediadoras. Además, este complejo es necesario para iniciar la resección del DSB y dar lugar a una cadena simple de ADN (ssADN), intermediario necesario para la reparación por recombinación homóloga y también para activar la vía de ATR. (Adams et al., 2006; Cuadrado et al., 2006; Jazayeri et al., 2006; Myers and Cortez, 2006)

La resección en la reparación de los DSB también requiere de la actividad de CDKs y está restringida a las fases S y G2 del ciclo celular (Jazayeri et al., 2006) Una vez generado el ssADN es cubierto por la proteína RPA que facilita el reclutamiento de ATR-ATRIP.

3.1.2 Mediadores

Están constituidos por proteínas que son reclutadas a los sitios de daño, como MDC1, 53BP1, BRCA1, claspina y Brit1/Mcph1 (Bartek and Lukas, 2003; Petrini and Stracker, 2003). A diferencia de las proteínas sensoras, que se acumulan en los sitios de daño de una manera ATM independiente, el reclutamiento de estas proteínas mediadoras a los *foci* de daño depende de la fosforilación de γ H2AX por ATM (Lukas et al., 2004)

3.1.3 Transductores

ATM y ATR funcionan como proteínas quinasas apicales de los puntos de control (Abraham, 2001; Shiloh, 2003). En general ATM responde principalmente a las lesiones de tipo DSBs, mientras que ATR es activada por ssADN y horquillas de replicación atascadas (Bartek and Lukas, 2007; Shiloh, 2003). ATM se encuentra en forma de dímero inactivo en ausencia de daño. Cuando es reclutada a los DSBs, se disocia y se autofosforila en múltiples residuos necesarios para la correcta actividad de la enzima en humanos (Bakkenist and Kastan, 2003; Jazayeri et al., 2006; Kozlov et al., 2006). En cuanto a ATR, no se observa un cambio en la actividad quinasa de la enzima y se sugiere que podría estar constitutivamente activa pero que su función sería dependiente de su ubicación subcelular. ATR en células humanas forma un complejo con ATRIP (*ATR-interacting protein*) que ha sido descrito como un potencial compañero regulatorio. La actividad tanto de ATM como de ATR involucra el reclutamiento de las mismas a los sitios de lesión en el ADN a través de los motivos conservados en los C-terminales de Nbs1 y ATRIP respectivamente (Zou L. Et al, 2002). Estos motivos conservados son críticos para el reclutamiento y también para los eventos de señalización que gobiernan la maquinaria de la respuesta al daño al ADN (DDR, *DNA Damage Response*). El descubrimiento de los motivos conservados sugiere similitudes no esperadas entre las principales PIKKs involucradas en el DDR y muestra que sus mecanismos de acción en las etapas tempranas de los *checkpoints* están más conservados de lo que previamente se pensaba. (Falck et al., 2005; You et al., 2005).

Las cascadas de fosforilaciones iniciadas por las PIKKs son amplificadas por las serina/treonina quinasas Chk1 y Chk2. Chk2 es una proteína estable que se expresa a lo largo del ciclo celular (Lukas et al., 2001). Chk2 es inactiva en ausencia de daño y es activada principalmente por ATM en respuesta DSBs. Su activación involucra dimerización y autofosforilación. En contraste, Chk1 es una proteína lábil restringida a

las fases S y G2 del ciclo celular, está activa aún en células sin perturbar y, a pesar de que es adicionalmente activada por ATR en respuesta al daño por UV o al estrés replicativo, no requiere de dimerización o autofosforilación. Originalmente se relacionó la activación de Chk1 por ATR y de Chk2 por ATM, sin embargo, este concepto ha sido modificado por trabajos que demuestran la existencia de varios entrecruzamientos o *crosstalks* entre estas quinasas, ejemplificado por la fosforilación/activación de Chk1 por ATM en respuesta a las radiaciones ionizantes (Gatei et al., 2003; Sorensen et al., 2003) .

3.1.4 Efectores

Las proteínas efectoras constituyen un amplio y diverso grupo compuesto por reguladores del ciclo celular, proteínas de la maquinaria de reparación del ADN, componentes y reguladores de la cromatina y la apoptosis. Luego de su activación, Chk1 y Chk2 fosforilan a sus genes blanco efectoras río abajo y propagan la señalización de la respuesta al daño. Chk2 fosforila a las proteínas BRCA, PIK3, Pml y E2F-1, mientras que Chk1 fosforila a Tlk1/2. Ambas quinasas comparten sustratos y fosforilan a Mdm2, p53, cdc25A y Cdc25C. (Bartek and Lukas, 2003; Donzelli and Draetta, 2003; Jazayeri et al., 2006; Shiloh, 2003; Stucki and Jackson, 2006) (Zhou and Elledge, 2000).

3.2 Checkpoints G1, S y G2

Como fue mencionado anteriormente, se denomina *checkpoints* a las cascadas de transducción de señales que sensan daños en el ADN, promueven el arresto del ciclo celular dando tiempo para que la reparación ocurra y activan la muerte celular o la senescencia si el daño escapa a las posibilidades de reparación. Los *checkpoints* son mecanismos de control, externos al ciclo celular, que no son requeridos para la progresión del mismo. Una característica fundamental de un *checkpoint* es que su actividad no se manifiesta en ausencia de errores en el ADN y solo cuando surgen condiciones de estrés donde es altamente probable la aparición de lesiones, los *checkpoints* resultan herramientas esenciales para la sobrevivencia (Khodjakov and Rieder, 2009). Esto no implica que estén inactivos en ausencia de errores, como muchas veces es sugerido cuando, frente a un tratamiento, se describe la "activación" o el "disparo" de un *checkpoint*. Como el rol de un punto de control es

detectar un problema, el mecanismo de monitoreo tiene que estar activo antes de que el problema surja.

3.2.1 *Checkpoint G1*

Luego de daño genotóxico, ATM/ATR activas fosforilan directamente el factor de transcripción p53, que también es blanco de Chk1 y Chk2. La ligasa de ubiquitina MDM2, que normalmente se une a p53 asegurando su degradación, también es fosforilada por ATM/ATR luego del daño y por Chk2/Chk1. Esto contribuye a la acumulación de p53 y al aumento de su actividad como factor de transcripción. En consecuencia, aumenta el nivel de p21Cip1 causando un arresto en G1. Este hecho, no sólo impide el inicio de la síntesis de ADN, sino que también preserva la vía Rb/E2F en su forma activa, supresora del crecimiento, causando un bloqueo sostenido en G1 (Kastan and Bartek, 2004; Massague, 2004). En G1 tardía, como respuesta a un estrés genotóxico y por las actividades aumentadas de Chk1 y Chk2, se produce la degradación de CDC25A, una fosfatasa necesaria para la progresión de G1 a S que activa CDK2 por remoción de dos fosfatos inhibitorios. Como consecuencia de esta degradación se inhiben los complejos ciclina E(A)/CDK2. El *checkpoint* de Chk1/ Chk2-CDC25A es implementado rápidamente, independientemente de p53, y retrasa la transición G1/S (Bartek and Lukas, 2003; Donzelli and Draetta, 2003).

3.2.2 *Checkpoint S*

EL arresto en la fase S es iniciado cuando horquillas de replicación quedan atascadas a causa del ADN dañado (Bartek et al., 2004). Las funciones de este *checkpoint* son dos: por un lado, inhibir la iniciación de la replicación a partir de orígenes nuevos y, por otro, proteger la integridad de las horquillas atascadas permitiendo la recuperación de la progresión del ciclo celular luego de la reparación del ADN. Los componentes claves de esta maquinaria son la proteína RPA, el complejo ATR-ATRIP, la proteína mediadora claspina, RAD17 y el complejo (9-1-1).

El *checkpoint* intra-fase-S: es activado por DSBs generados en los *loci* genómicos externos a los replicones activos (Bartek et al., 2004). La característica fundamental que diferencia este control del anterior es su independencia de las horquillas de replicación. En estas células, Chk1 o Chk2 fosforilan a CDC25A induciendo su degradación y la posterior inactivación del complejo ciclina E/CDK2. Este evento

impide la unión de CDC45 (proteína esencial para la iniciación de la replicación) al origen de replicación produciendo el arresto en la fase S (Bartek et al., 2004).

3.2.3 Checkpoint G2

Este control impide que las células inicien mitosis cuando sufren daño en el ADN durante G2, o cuando pasan por G2 con algún daño no reparado inflingido durante las fases previas S o G1. El blanco crítico es la actividad de CDK1. La fosfatasa CDC25 es necesaria para la actividad de CDK1 en G2. Luego de estrés genotóxico, Chk1 y Chk2 actúan fosforilando CDC25, que resulta ubiquitinada y degradada inhibiendo CDK1 arresando el ciclo en la fase G2 (Guardavaccaro and Pagano, 2006).

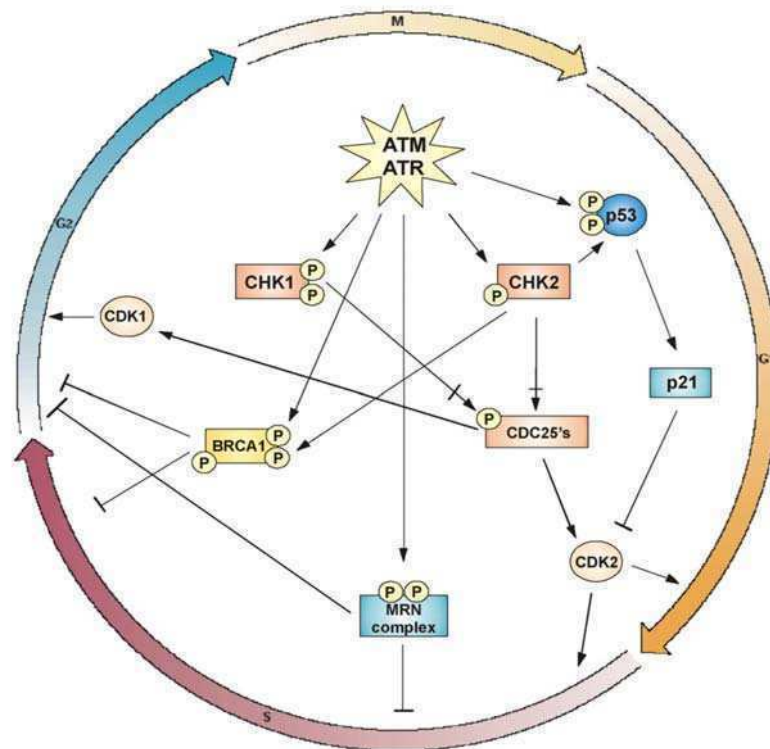


Figura V. Los principales transductores de la señal que siguen a la activación de ATM / ATR y el sitio en el cuál impactan en la progresión del ciclo celular. (Adaptado de Shiloh Y. et al., 2003).

4. Sistemas de Reparación

Los puntos de control sensan el daño, arrestan el ciclo celular y, a su vez, activan los sistemas de reparación que representan la segunda parte fundamental de la respuesta al daño al ADN.

Frente a la gran variedad de lesiones, a lo largo de la evolución, se han desarrollado varios sistemas de reparación del ADN, que en conjunto cubren la mayor parte de las lesiones sufridas en la información genética de una célula. Cuál de los sistemas de reparación es activado en respuesta al daño depende tanto del tipo de lesión como de la fase del ciclo celular en la cual ocurra (Branzei and Foiani, 2008).

Los principales mecanismos de reparación descritos hasta el momento que operan en mamíferos son los siguientes: la reparación por escisión de nucleótidos (*nucleotide excision repair*, NER), la reparación por escisión de base (*base excision repair*, BER), reparación por recombinación homóloga y no homóloga (*homologous recombination* HR, *Non-homologous end joining* NHEJ) y la reparación de los errores de apareamiento (*mismatch repair*, MMR)

4.1 Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER)

Este mecanismo de reparación está destinado a reparar lesiones que distorsionan la estructura helicoidal del ADN. Entre los agentes que provocan este tipo de alteraciones se incluyen la radiación UV, químicos mutagénicos y drogas quimioterapéuticas que forman aductos en el ADN (Leibeling et al., 2006). En este mecanismo han sido identificadas dos subvías que tienen, en parte, distintas especificidades de sustrato. Estas dos subvías se denominan: reparación global del genoma (*global genome repair*, GGR), la cual es responsable de la reparación de lesiones en las zonas no transcritas del genoma que distorsionan su estructura, y reparación acoplada a la transcripción (*transcription-coupled repair*, TCR), que actúa sobre los genes activos transcripcionalmente, reparando los daños que bloquean la elongación de la ARN polimerasa (Batty and Wood, 2000; de Laat et al., 1999; Hoeijmakers, 2001; Mitchell et al., 2003; Tornaletti and Hanawalt, 1999)

En ambos casos, la reparación de la lesión involucra los mismos pasos, exceptuando la detección del daño. Luego del reconocimiento de la lesión, ocurre el reclutamiento del complejo TFIIH con actividad helicasa que abre una región de aproximadamente 30 nucleótidos alrededor de la lesión, a continuación son reclutadas

las endonucleasas ERCC1-XPF y XPG que generan las incisiones en 5' y 3' y por último, la síntesis y ligación de la nueva secuencia de ADN sintetizada (**Figura VI**).

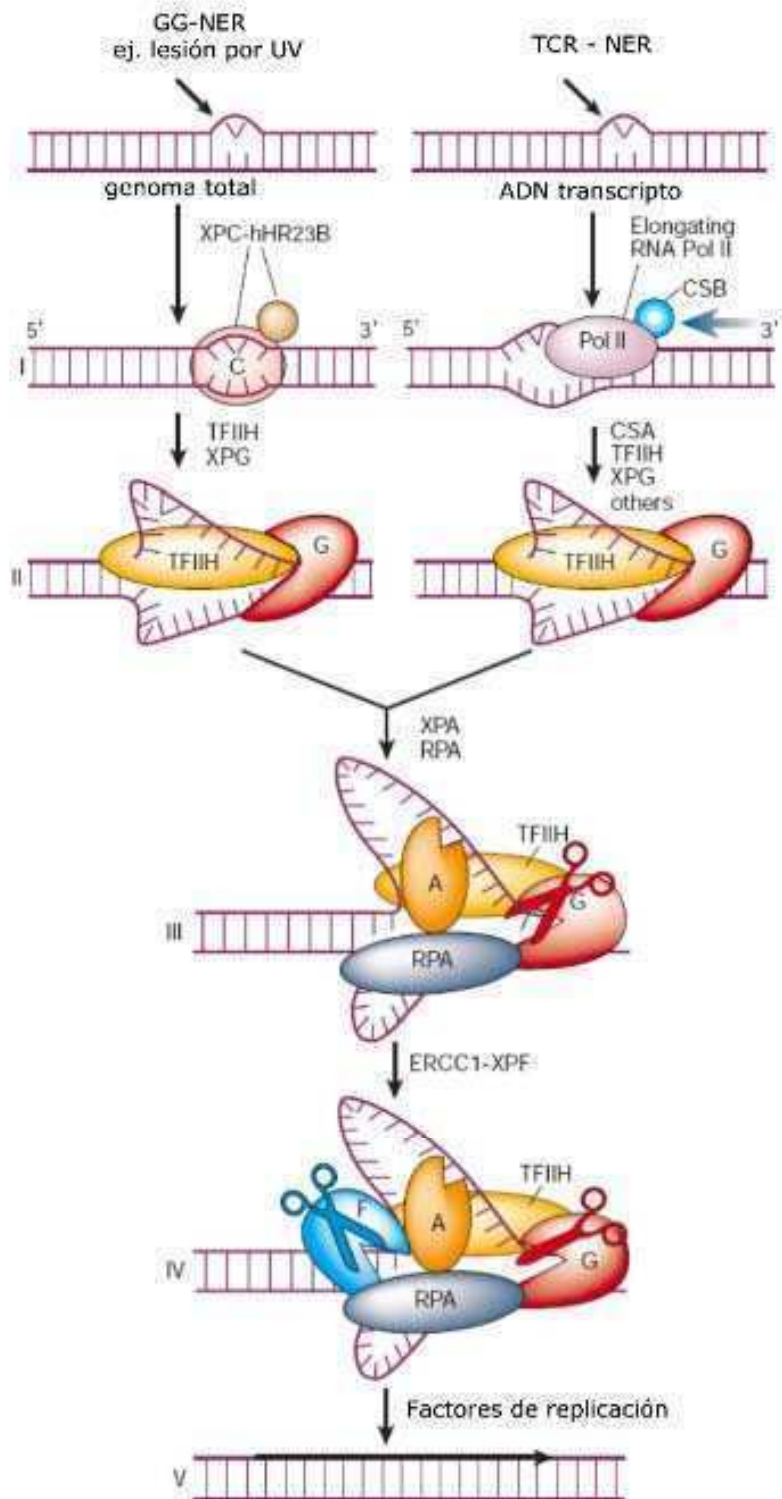


Figura VI. Mecanismo de reparación por NER genómico global (GG-NER) y NER acoplado a transcripción (TCR-NER). (Jan Hoeijmakers, NATURE Vol 411, 17 Mayo 2001.)

4.2 Reparación por Escisión de Base (BER)

La vía de reparación BER es responsable de la reparación de las bases oxidadas y alquiladas, así como también de los sitios abásicos generados por depuración espontánea. En general, las lesiones que son sustrato de BER incluyen aquellas que no distorsionan el esqueleto de ADN suficientemente como para detener las horquillas de replicación. En consecuencia, la inactivación de BER puede ser altamente mutagénica. La lesión más prevalente y altamente mutagénica que debe ser corregida por BER es la base oxidada, 8-oxo guanina (también conocida como 8-oxoG o 8-oxo-7,8-dihidroguanina), que puede aparearse tanto con citosina o adenina. Si no es detectada, 8-oxoG resulta en una transversión de G:C a T:A, que es la segunda mutación más común hallada en cánceres humanos .

Las enzimas más importantes en el BER son las ADN glicosilasas. Estas enzimas remueven las bases modificadas o dañadas, y luego el sitio apurínico o apirimidínico (AP) es removido por una AP endonucleasa, la p-desoxirribosa resulta escindida por una fosfodiesterasa. Por último, el fragmento faltante es sintetizado por una ADN polimerasa y la hebra es unida por una ligasa (Bruner et al., 2000; Klungland et al., 1999) (**Figura VII**).

4.3 Mismatch Repair (MMR)

El rol principal del mecanismo MMR es el de reparar apareamientos faltantes o incorrectos causados por pequeñas deleciones o inserciones que se generan durante la replicación del ADN y la recombinación homóloga. En eucariotas, los apareamientos incorrectos producidos durante la replicación son reconocidos por los heterodímeros MSH2/MSH6 y MSH2/MSH3. El primero reconoce principalmente apareamientos incorrectos entre bases y el segundo loops de inserción o deleción. A estos heterodímeros se les une un tercero, MLH1/PMS2, formando un complejo que promueve la reparación por su actividad nucleolítica conduciendo a la escisión del apareamiento erróneo (Kadyrov et al., 2009). En el paso siguiente, la hebra es nuevamente sintetizada y los fragmentos de ADN son ligados (Fleck and Nielsen, 2004).

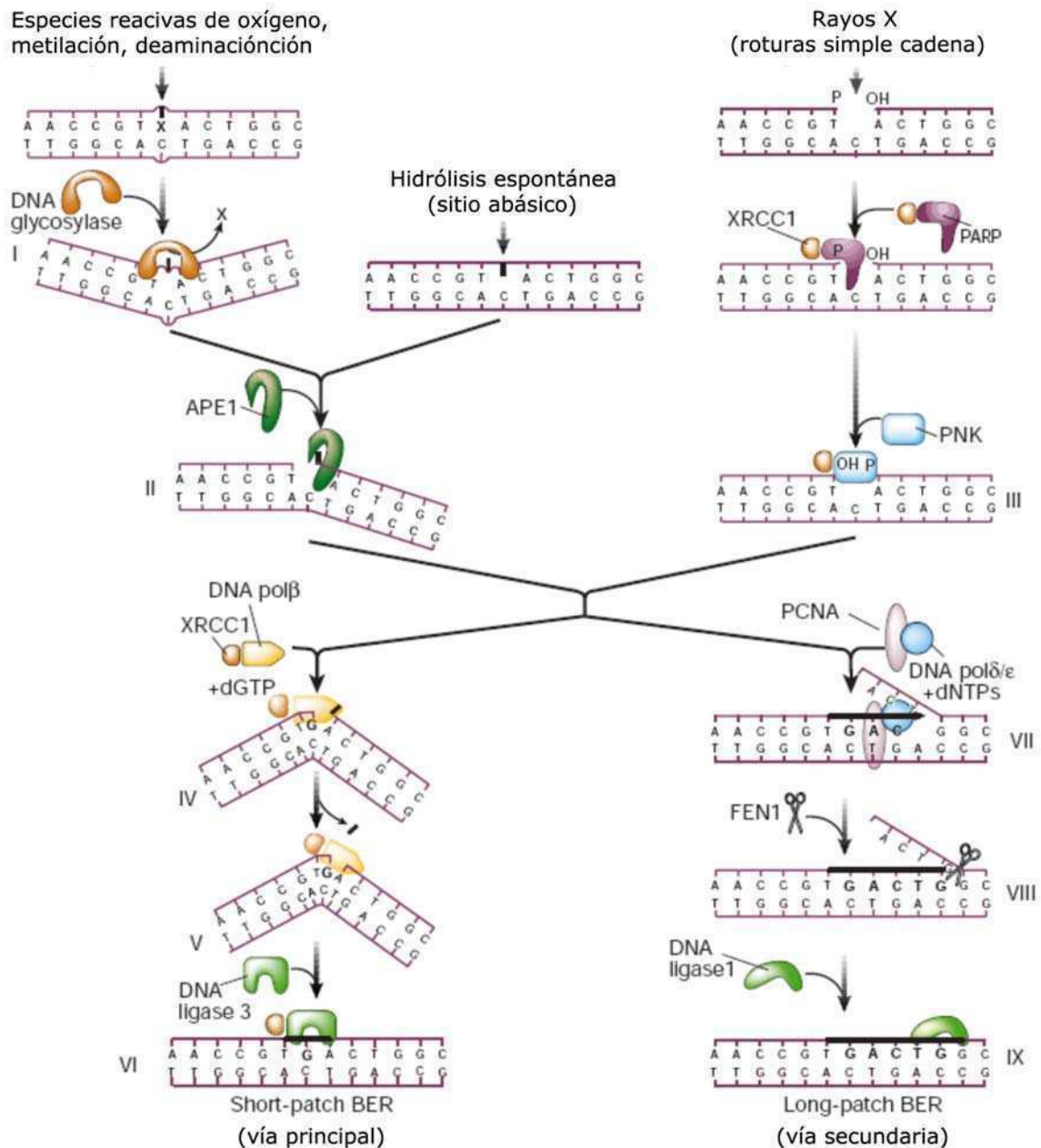


Figura VII. Mecanismos de reparación de la vía BER. (Modificado de Jan Hoeijmakers, NATURE Vol 411, 17 May 2001.)

4.4 Mecanismo de reparación por Recombinación Homóloga (HR)

El mecanismo de recombinación homóloga participa en la reparación de los daños al ADN de tipo doble cadena. Es un mecanismo que actúa libre de errores puesto que utiliza un templado homólogo en el proceso de reparación. La recombinación homóloga parece dominar durante las fases S y G2, momento en que el ADN está

duplicado, proveyendo una copia fiel de la secuencia que es la cromátida hermana, para alinear los daños (Sung and Klein, 2006).

El complejo MRN participa en el reconocimiento del DSB y en el procesamiento de los extremos de ADN. El complejo CtIP-BRCA1-BATD1 coopera con el complejo MRN en la remoción de nucleótidos que generan una secuencia de ssADN. A esta secuencia simple cadena se le une la proteína RPA para impedir la formación de estructuras secundarias en el ADN. En el sitio se acumula, además, BRCA2 que a su vez promueve la unión de RAD51 en el extremo 5' libre. Rad51 encuentra la secuencia homóloga que se utilizará en la reparación del daño (Hartlerode and Scully, 2009).

Existen varias vías de reparación por recombinación homóloga describiéndose como principales la vía SDSA (por *synthesis-dependent strand annealing*) y la vía DSBR (por *double-strand break repair*). En ambos modelos se observa invasión de una secuencia de 32 nucleótidos en la secuencia homóloga. En general esta secuencia se encuentra en la cromátida hermana, y comienza la extensión de la hebra entrante por polimerasas de ADN, restaurando la información genética en el sitio de la lesión. Las vías SDSA y DSBR varían en el modo de resolución del evento de reparación. Mientras que en la vía DSBR existe intercambio de fragmentos de ADN entre el sitio original de daño y la secuencia homóloga tanto de tipo *non-crossover* como *crossover*, en la vía SDSA la hebra nueva, sintetizada a partir de la secuencia homóloga, se desplaza luego a su sitio original sin intercambio de fragmentos entre los dos sitios (Sung and Klein, 2006) (**Figura VIII**).

4.5 Mecanismo de reparación por unión de extremos no homólogos (NHEJ)

El mecanismo de reparación por unión de extremos no homólogos es otra vía involucrada en la reparación de DSBs, y resulta de particular importancia en la fase G₀, G₁, y en la fase S temprana del ciclo celular cuando aún no fue duplicado el material genético. El mecanismo de NHEJ involucra la religación de dos extremos de ADN y, debido a que esta reacción no es reguiada por un ADN molde, es propensa a cometer errores (Delacote and Lopez, 2008). Los extremos de ADN formados por las DSBs reclutan el heterodímero de Ku (Ku70/80) y luego la quinasa ADN-PKcs junto con otras proteínas que procesan el ADN y generan extremos adecuados para la ligación. Finalmente, el complejo X4-L4 junto con XLF liga los extremos sellando la rotura. (Hartlerode and Scully, 2009) (**Figura IX**).

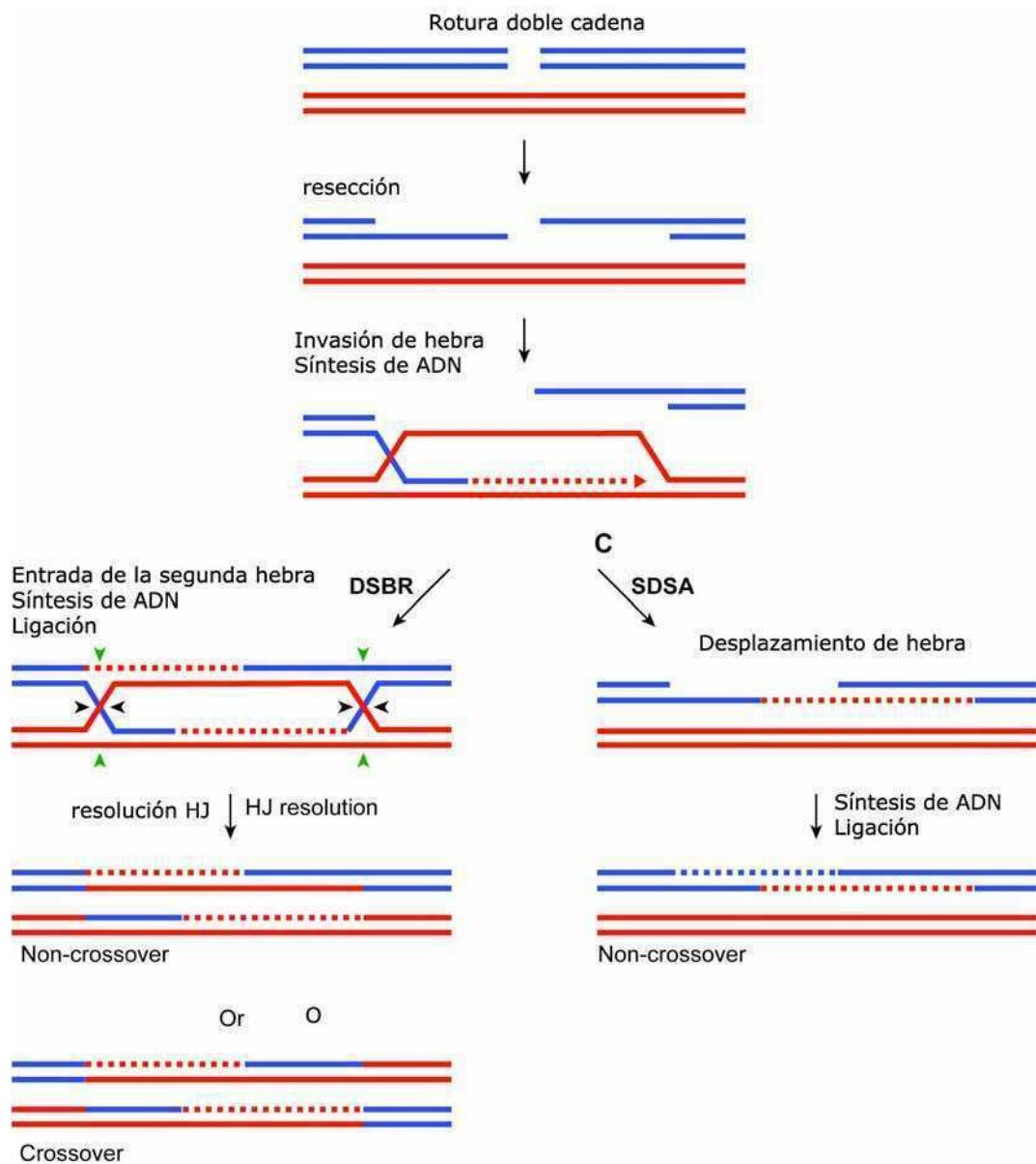


Figura VIII. Reparación de roturas doble cadena por mecanismo de recombinación homóloga (DSBR y SDSA). (Modificado de Patrick Sung y Hannah Klein, Oct. 2006, Mol.Cell Biol., vol. 7., 739-750.)

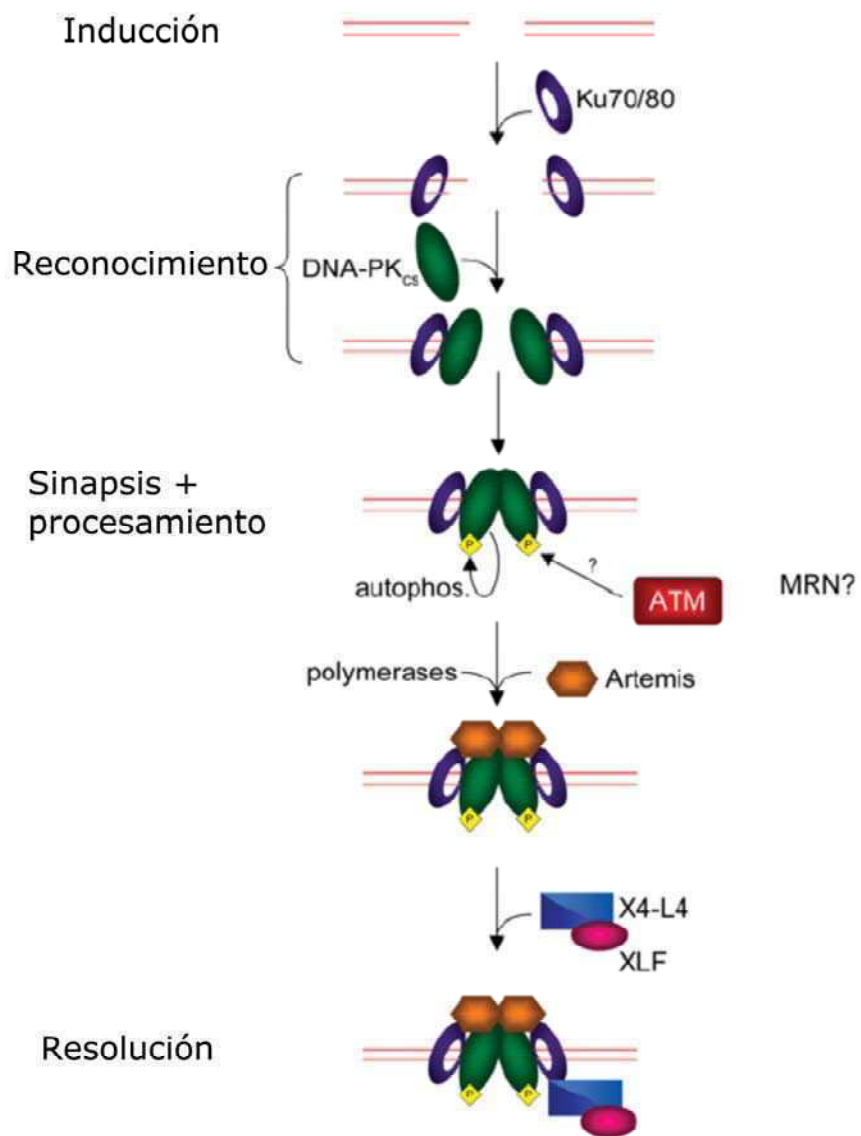


Figura IX . NHEJ en mamíferos. (Adaptado de Andrea J. HARTLERODE and Ralph SCULLY

Biochem. J. (2009) 423, 157–168.)

A modo de resumen, en la siguiente figura se representan las vías de respuesta al daño al ADN y los mecanismos involucrados.

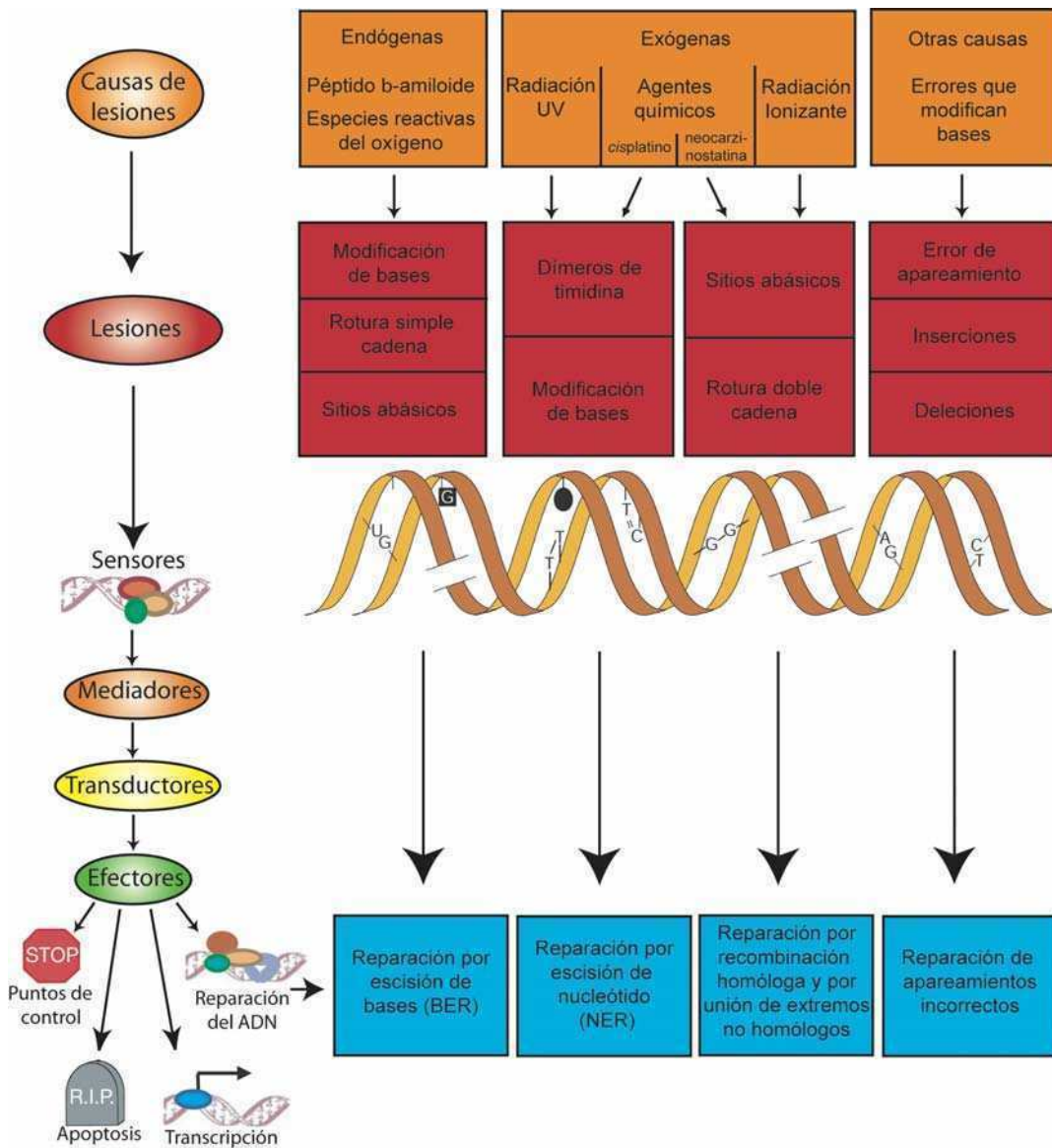


Figura X. Vías de respuesta al daño al ADN. (Modificado de Zhou y Elledge, 2000; Hoeijmakers, 2001 y Shiloh, 2003.)

OBJETIVOS e HIPÓTESIS

Los cuatro miembros de la familia INK4 poseen una estructura similar y son igualmente potentes como inhibidores de CDK4/6. Sin embargo, y a pesar de este papel redundante, son diferencialmente expresados en el desarrollo y, en términos de funciones biológicas, se ha observado la participación de diferentes miembros de la familia en distintos procesos fisiológicos como la diferenciación y senescencia celular. Además, algunas INK4 están ausentes o inactivadas por mutaciones en diversos tipos de cánceres, representando supresores tumorales o candidatos a serlo. Por otra parte, la gran diversidad en su patrón de expresión, sugiere que esta familia de inhibidores del ciclo celular podría tener funciones específicas de tejido o de tipo celular.

Objetivo General

El objetivo general planteado en este trabajo consistió en estudiar la participación de p19INK4d en la respuesta celular al daño genotóxico y su mecanismo de acción.

A partir de este objetivo general se desprendieron los siguientes objetivos específicos.

Objetivos Específicos

- 1- Estudiar la participación de la proteína p19INK4d en la reparación del ADN.

- 2- Analizar la fosforilación como mecanismo de activación de p19INK4d frente al daño al ADN.

- 3- Determinar la relevancia fisiológica del proceso de fosforilación de p19INK4d en respuesta a genotóxicos.

- 4- Analizar proteínas interactoras de p19INK4d ligadas a su función en la reparación del daño.

Hipótesis

La célula responde al daño en el ADN activando una serie de procesos coordinados que involucran la progresión del ciclo celular, programas transcripcionales, la reparación del ADN, el remodelamiento de la cromatina y la muerte celular.

Postulamos que p19INK4d participa de los mecanismos involucrados en el mantenimiento de la integridad del genoma cumpliendo una función en la reparación del ADN, independiente de su actividad como inhibidor del ciclo celular. Proponemos, que esta función está regulada por procesos de fosforilación sobre esta proteína relacionados a la respuesta celular activada frente al daño genotóxico. Y además, que la fosforilación conduce a cambios conformacionales en la estructura de p19INK4d, permitiendo su interacción con proteínas relacionadas con el proceso de detección y/o reparación del ADN, ejerciendo de este modo su función en el mantenimiento de la integridad del genoma.

RESULTADOS

Capítulo 1: Participación de p19INK4d en la reparación del ADN

1.1 p19INK4d se expresa en forma periódica en el ciclo celular en células de Leydig MA-10

p19 se expresa en altos niveles en órganos específicos, como cerebro y testículo. Fue reportado que ratones deficientes en p19 presentan atrofia testicular, apoptosis de células germinales y menor espermatogénesis. Las células de Leydig son esenciales para la espermatogénesis, puesto que producen testosterona necesaria en este proceso (Zyndy F. et al 2000, Zyndy F. et al 2001). En este sentido, la utilización de células derivadas de tejido testicular resulta un sistema interesante para el estudio de p19 y de potencial relevancia fisiológica. En esta primera parte del trabajo utilizamos una línea celular establecida a partir de testículo de ratón, específicamente de células de Leydig y denominada Leydig MA-10 (MA-10).

La expresión periódica de p19 a lo largo del ciclo celular fue descrita en varios tipos celulares (Hirai et al., 1995; Thullberg et al., 2000). En primer lugar, buscamos entonces analizar la expresión de esta proteína en el ciclo celular del sistema en estudio. Para ello, las células de Leydig MA-10 fueron sincronizadas en G0 mediante la privación de suero por 36 horas y luego de este tiempo, las células fueron estimuladas a ingresar al ciclo celular por adición de medio fresco conteniendo 10% de suero.

Con el objeto de controlar la sincronización de los cultivos cuantificamos por citometría de flujo la proporción de células en cada fase del ciclo celular a los distintos tiempos luego de liberado el arresto de la fase G0. Con los datos obtenidos estimamos en 24 horas la duración del ciclo celular de las células MA-10, y determinamos la duración de cada fase del ciclo de esta línea celular (**Figura 1C**).

Por otro lado, evaluamos los niveles de ARNm de p19 por ensayos de Northern blot y de proteína p19 por Western Blot a diferentes tiempos. Observamos que los niveles de ARNm de p19 comienzan a detectarse a las 4 horas de liberado el arresto del ciclo celular, período correspondiente al final de la fase G1 y que sus niveles máximos se alcanzan entre las 8 y 12 horas cuando las células ingresan y transitan en la fase S, para luego disminuir a las 24 horas, fase G2/M. Los niveles de ARNm de p19 se observan aumentados a las 28 horas momento en el cual las células se encuentran nuevamente en la fase G1 (**Figura 1A**). Los niveles de proteínas observados a lo largo del ciclo celular muestran correlación con la cinética del ARNm de p19 (**Figura 1B**).

En conclusión, y como fue descripto para otros tipos celulares, la expresión de p19, tanto el ARNm como la proteína, en células de Leydig MA-10, resultan ser periódicas, comenzando su expresión en la fase G1, observándose su máxima expresión en la fase S para luego ir disminuyendo durante las fases G2 y M cuando ocurre la división celular.

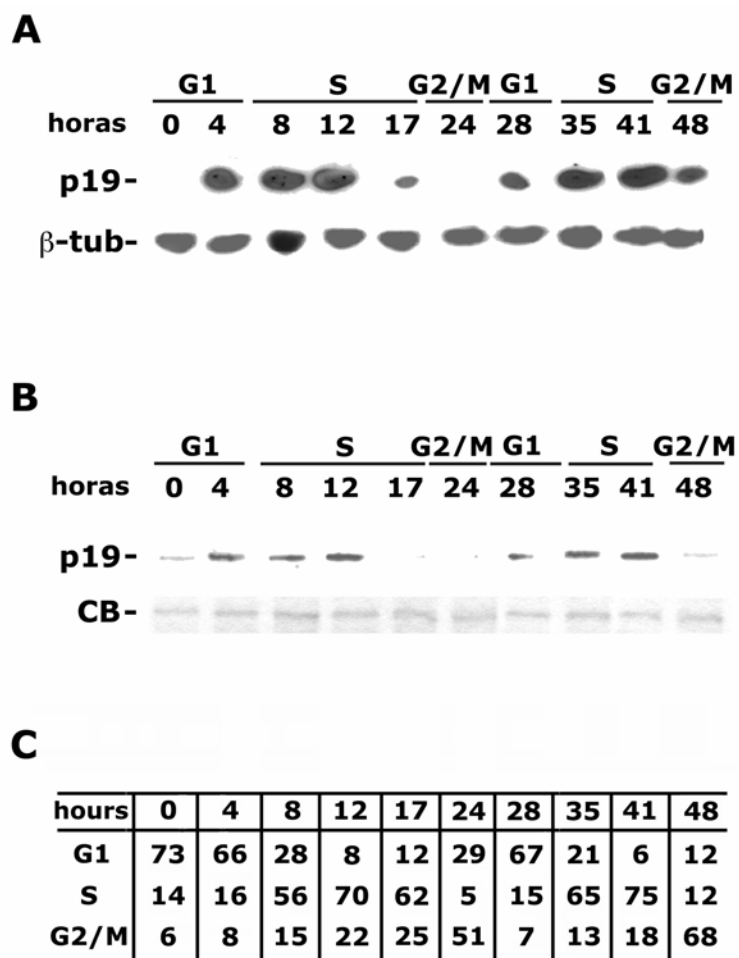


Figura 1. Expresión de p19 durante la progresión del ciclo celular. Las células MA-10 fueron incubadas en medio sin suero por 36 horas para establecer un estado de quiescencia, luego fueron estimuladas para reentrar al ciclo celular en forma sincronizada por agregado de suero. **(A)** ARN total (20µg) extraído de células a partir de los tiempos indicados fueron analizados por Northern blot con las sondas marcadas con P³² indicadas en el margen izquierdo. **(B)** Niveles de proteína p19 a lo largo del ciclo. p19 fue inmunoprecipitada a partir de las diferentes muestras y los complejos inmunes analizados por Western blot. Se muestra una banda representativa de nivel de carga de proteínas en la inmunoprecipitación. β-tub, β-tubulina; CB, coomasie blue **(C)** Las fases y la duración del ciclo celular fueron determinadas mediante citometría de flujo. En la tabla se indica la cantidad de células en porcentaje.

1.2 La expresión de p19INK4d es inducida por radiación UV

La hipótesis de este trabajo sugiere la participación de p19 en la respuesta celular disparada por daño genotóxico. Si esta hipótesis resultara correcta, una de las posibilidades que surge es la de un cambio en los niveles de expresión de p19 luego de inducir el daño al ADN, hecho que fue descrito para una amplia gama de proteínas, como por ejemplo p21Cip1 (Fotodar et al., 2004).

Como primer abordaje, utilizamos radiación UVC que genera predominantemente dímeros de pirimidinas de tipo ciclobutano (CPD) y fotoproductos pirimidina (6-4) pirimidona. Las células MA-10 fueron irradiadas con diferentes dosis de luz UVC (4 , 8 y 12 mJ /cm²) y 24 horas luego del daño fueron evaluados los niveles de ARNm de p19. Encontramos efectivamente que los niveles de ARNm de p19 resultan inducidos por luz UV con un incremento significativo a partir de una dosis de 4 mJ/cm² (**Figura 2**). Como control de la efectividad del daño evaluamos los niveles de ARNm de p21Cip1, observando, como era esperado, un incremento significativo en función del daño aplicado.

Evaluamos además, la inducción de p19 en función del tiempo, a las 12, 24 y 48 horas luego de la irradiación con UV. Observamos un aumento transitorio en los niveles de ARNm de p19 entre las 12 y 24 horas posteriores al daño y que correlacionan con un aumento en los niveles proteicos de la misma (**Figura 3A y B**).

Con el objeto de determinar si el efecto de UV es un evento general y no una observación de esta línea celular en particular, estudiamos la expresión de p19 en otras líneas celulares de distinto origen. En este estudio empleamos cultivos primarios de células de Leydig de rata, fibroblastos de hamster BHK-21 y fibroblastos humanos WI-38. Para los tres tipos celulares, se observó inducción de p19 con una dosis de 4 mJ/cm² (**Figura 4**)

Estos resultados demuestran que la expresión de p19 es inducida en respuesta al daño genotóxico provocado por luz UV, sugieren que este aumento estaría dado por una regulación a nivel transcripcional y que representa una respuesta celular general no ligada a un tipo celular específico.

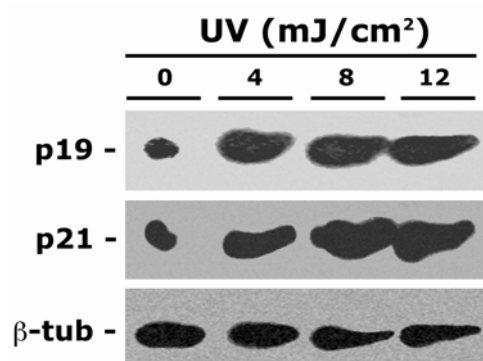


Figura 2. Efecto de la dosis de radiación UV en la expresión de p19. Células MA-10 fueron irradiadas con las dosis de UV indicadas y cosechadas luego de 24 horas de irradiación. ARN total (20 µg) de los lisados celulares fueron analizados por Northern blot con las sondas marcadas con ³²P indicadas en el margen izquierdo. La figura es representativa de 2 ensayos independientes.

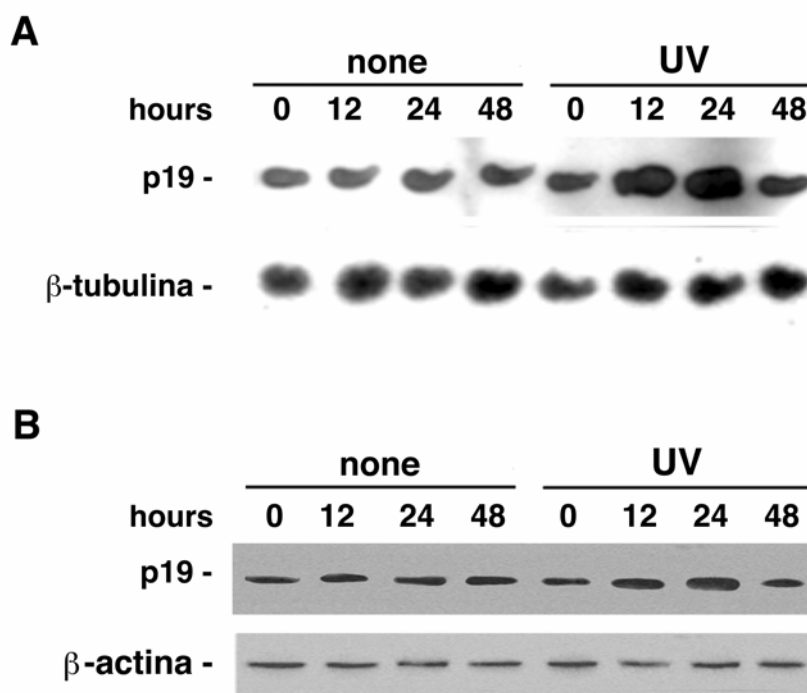


Figura 3. Expresión de p19 en función del tiempo luego de daño por UV. (A) Células MA-10 fueron irradiadas con 8 mJ/cm² de UV y cosechadas luego de 24 horas del daño. ARN total (20 µg) de los lisados celulares fue analizado por Northern blot con las sondas marcadas con P³² indicadas en el margen izquierdo. (B) La expresión de la proteína p19 fue analizada por Western blot. La figura es representativa de 2 ensayos independientes.

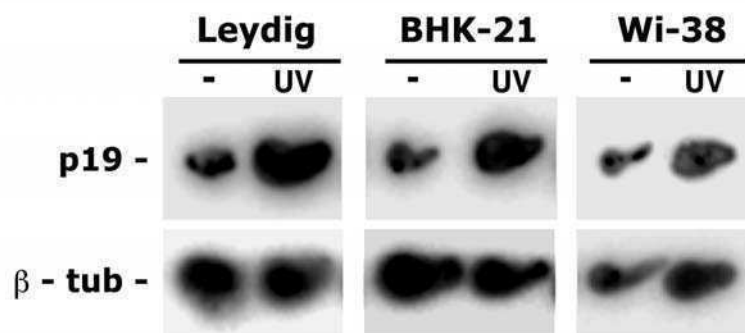


Figura 4. Inducción de la expresión de p19 por UV en distintos tipos celulares. Cultivos primarios de células de Leydig, células BHK-21 y WI-38 fueron irradiados o no con 8 mJ/cm^2 de UV y luego de 24 horas fueron cosechadas. ARN total ($20 \mu\text{g}$) de los lisados celulares fueron analizados por Northern blot con las sondas marcadas con ^{32}P indicadas en el margen izquierdo. La figura es representativa de 2 ensayos independientes.

1.3 p19 es la única INK4 cuya expresión es inducida por radiación UV

Nos preguntamos luego si el efecto de UV sobre p19 sería particular de este inhibidor o una característica también de los demás miembros de la familia INK4. Para estudiar este punto, células MA-10 fueron irradiadas con una dosis de 8 mJ/cm^2 de UV y, en alícuotas tomadas 12, 24 y 48 horas luego del daño, se determinaron los niveles de ARNm de los cuatro miembros de la familia INK4 por Northern Blot. Los resultados muestran que ninguno de los restantes inhibidores, p15, p16 ó p18, varían su expresión en respuesta al daño (**Figura 5**).

Estos resultados describen a p19 como el único miembro de la familia INK4 cuya expresión es inducida por daño genotóxico generado por radiación UV.

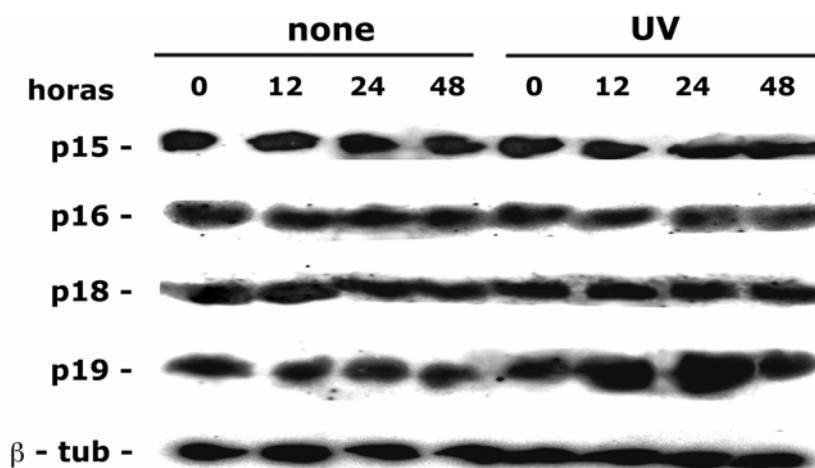


Figura 5. p19 es el único miembro de la familia INK4 que induce su expresión por UV. Células MA-10 fueron irradiadas con 8 mJ/cm^2 de UV y cosechadas luego de 24 horas de irradiación. ARN total ($20 \mu\text{g}$) de los lisados celulares fue analizado por Northern blot con las sondas marcadas con ^{32}P indicadas en el margen izquierdo. La figura es representativa de 2 ensayos independientes.

1.4 p19 participa en la reparación del ADN

Uno de los principales mecanismos de defensa que se dispara en respuesta al daño por agentes genotóxicos como la radiación UV es la activación de las vías de reparación del ADN (Guan et al., 1996). En base a los resultados descritos en las figuras anteriores postulamos que p19, inducida luego de daño genotóxico, podría participar en algún mecanismo de reparación en respuesta al daño.

1.4.1 Ensayo de reparación del ADN por HCR

Como primer enfoque para analizar esta hipótesis utilizamos el ensayo de *Host Cell Reactivation* (HCR). En este ensayo se mide la capacidad de las células de reparar un ADN dañado agregado exógenamente. La cantidad de ADN dañado que la célula puede reparar (ó reactivar) puede ser medida a través de la cuantificación de un gen reportero. En nuestro estudio, utilizamos como ADN exógeno el plásmido pCMVCAT que contiene la secuencia que codifica para la enzima cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) río abajo del promotor constitutivo y fuerte citomegalovirus (CMV). Para definir la dosis de UV más adecuada para dañar el plásmido realizamos una curva de dosis aplicando 3 energías distintas de UV ($16, 32$ o 64 mJ/cm^2). Estos plásmidos dañados

fueron luego transfectados en células MA-10 y 72 horas luego de la transfección las muestras fueron recolectadas y la actividad CAT evaluada.

En primer lugar, confirmamos que el tratamiento con UV ejercía un daño efectivo en el ADN ya que la expresión de CAT cuantificada 72 horas luego de la transfección mostró una disminución en función de la dosis de UV aplicada (**Figura 6**). La dosis que seleccionamos para continuar con estos ensayos fue de 32 mJ/cm². Esta dosis mostró una actividad disminuida en un 50% respecto del plásmido no dañado (**Figura 6**) considerándola una diferencia adecuada para evaluar cambios en la habilidad de reparación de las células en los diferentes tratamientos y sin ser una dosis demasiado alta que afectara el plásmido de modo irreversible.

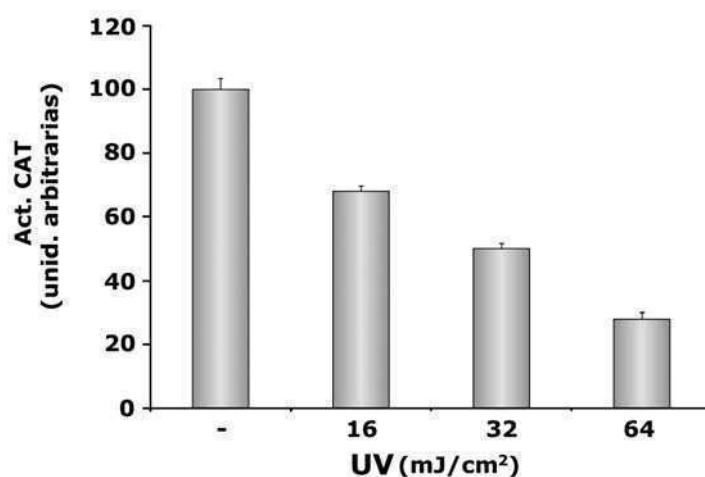


Figura 6. La dosis de 32 mJ/cm² de UV sobre el plásmido pCMVCAT es adecuada para su uso en HCR. Células MA-10 fueron co-transfectadas con el plásmido pCMVCAT previamente irradiado o no con distintas dosis de UV y el vector de referencia pCMVβgal. La expresión de CAT fue cuantificada 36 horas luego de la transfección y relativizada con la expresión de β-galactosidasa. La figura muestra la media ± D.E. de los valores obtenidos en dos ensayos independientes por triplicado.

Una vez definida la dosis a utilizar para dañar el plásmido, establecimos el tiempo post-transfección necesario para evaluar la actividad de CAT. Hicimos una curva de tiempo transfectando las células con el vector dañado con 32 mJ/cm² de UV y evaluamos actividad a las 24, 36, 48 y 72 horas post-transfección (**Figura 7A**). Se observa, nuevamente, que el plásmido resultó efectivamente dañado ya que, a las 24 horas, la actividad CAT es menor en el vector irradiado con UV respecto del vector control. Por otro lado, la reparación del daño resulta evidente dado que la velocidad con la que aumenta la actividad de CAT del ADN dañado es mayor que la del ADN control (**Figura 7B**). El aumento más pronunciado en la actividad relativa de CAT del vector con daño indica que, no solo esta actividad aumenta por acumulación en el

tiempo de la enzima, sino también por la reparación o reactivación de las secuencias CAT dañadas que ahora también expresan la proteína. Elegimos el tiempo de 48 horas para evaluar este ensayo en los experimentos siguientes, dónde resulta evidente la actividad de reparación sobre el ADN exógeno. Concluimos, además, que las células de Leydig MA-10 son un sistema adecuado para evaluar reparación de fotolesiones por HCR.

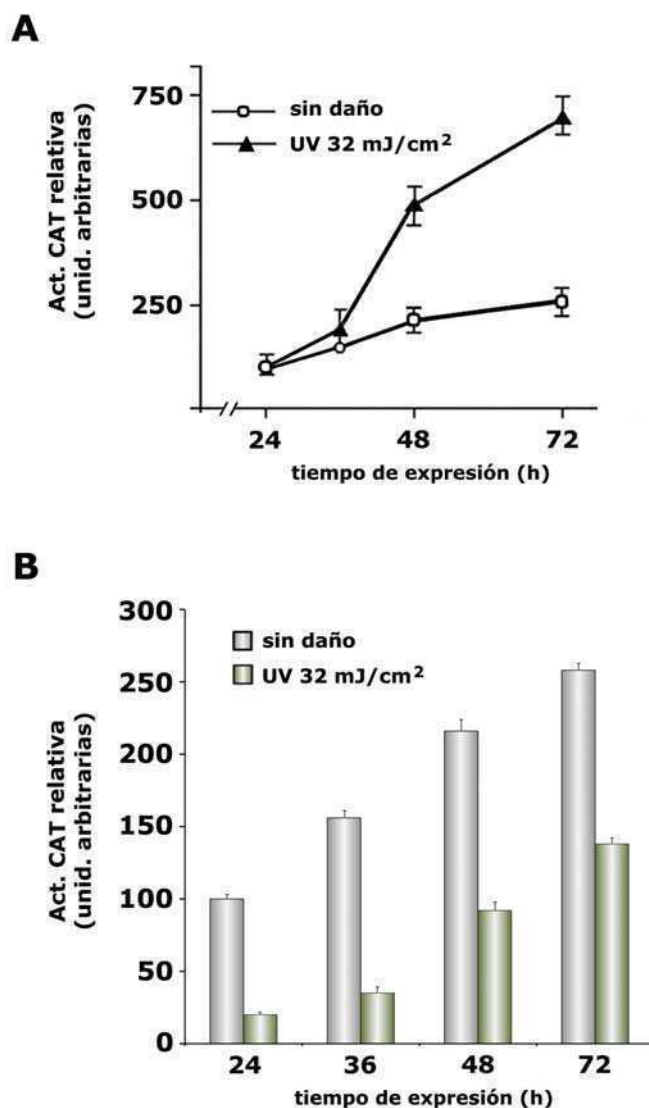


Figura 7. Elección del tiempo posterior a la transfección para medir actividad de CAT. Células MA-10 co-transfectadas con el plásmido pCMVCAT previamente irradiado o no con 32 mJ/cm² de UV y pCMVβgal sobre las cuales (A) la actividad de CAT fue determinada a distintos tiempos luego de la transfección y relativizada con la expresión de β-galactosidasa. (B) El resultado de (A) fue expresado como porcentaje de la actividad de la muestra de 24 horas sin daño, el cual fue establecido como 100. Cada punto representa el promedio ± S.E.M. de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

Definidos los parámetros para evaluar reparación por HCR en células de Leydig MA-10, buscamos analizar si la capacidad de las células de reparar el ADN resulta alterada por modificaciones en los niveles de la proteína p19. Observamos que la cotransfección de un vector de expresión de p19 con el plásmido pCMVCAT dañado aumenta significativamente, y en forma dosis dependiente la actividad relativa de CAT respecto a las células transfectadas solo con pCMVCAT irradiado, sugiriendo que la habilidad de reparar el ADN es fuertemente incrementada por p19 (**Figura 8**). Por el contrario, cuando los niveles endógenos de p19 fueron disminuidos por expresión del ADNc de p19 en dirección antisentido o por oligonucleótidos antisentido de esta proteína, se observó una disminución significativa de los niveles de reparación en comparación con las células con niveles basales de p19.

Estos resultados apoyan la hipótesis de la participación de p19 en la reparación del daño inducido por UV.

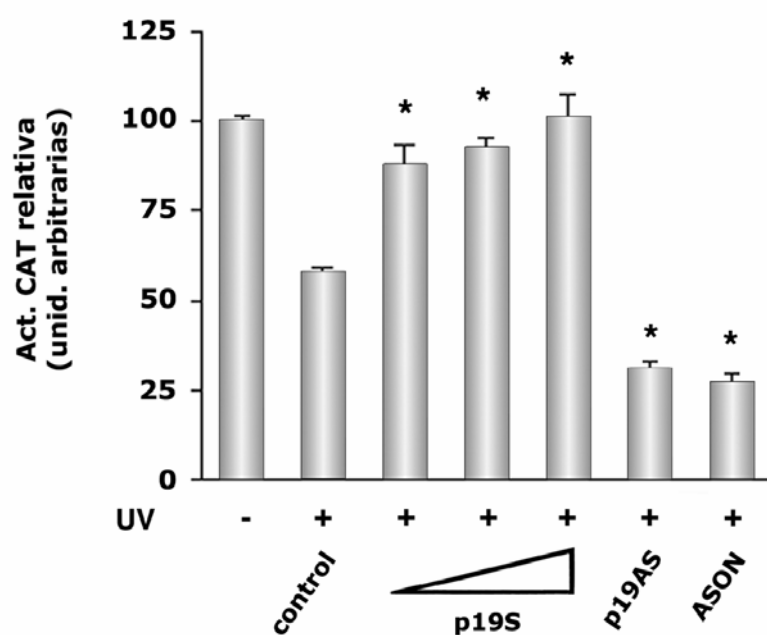


Figura 8. Diferentes niveles de p19 modifican la capacidad de las células de reparar un plásmido dañado. (A) Ensayos de HCR se realizaron en células MA-10 transfectadas con 4 μg de plásmido pCMVCAT dañado o no dañado por UV (32 mJ/cm^2) y co-transfectadas con cantidades crecientes del vector de expresión para el ADNc de p19 en dirección sentido (p19S; 2, 4, 8 μg) o antisentido (P19AS; 4 μg) o con un oligonucleótido de p19 antisentido (ASON; 2 μM). Los resultados están expresados como la actividad relativa de CAT con respecto al vector reportero no dañado que fue establecido en un valor de 100. Las barras representan el promedio + S.E.M. de 3 experimentos diferentes hechos por duplicado. El Test de Student fue utilizado para comparar la muestras transfectadas dañadas con las muestra control. (* $P < 0,05$).

1.4.2 Estudio de la capacidad de reparación del ADN por UDS

Como ya fue descrito, el mecanismo de reparación responsable de remover los aductos generados por UV en el ADN es el mecanismo NER. El mismo comprende dos vías: la de reparación acoplada a transcripción (TCR), generalmente la más rápida de las dos, la cual remueve el ADN dañado de las regiones transcribibles del genoma, y la reparación global del genoma (GGR), que elimina el daño en el resto de la cromatina. Como el ensayo de HCR involucra reactivación por la reparación de un gen transcripcionalmente activo, entonces, este ensayo principalmente evalúa la vía de reparación TCR cuando se utiliza como dañador luz UV (Johnson and Latimer, 2005).

Ahora, de modo de evaluar más en profundidad la participación de p19 en este mecanismo de reparación, empleamos el ensayo de "Síntesis de ADN No Programada" (*Unscheduled ADN Synthesis*, UDS) que mide la capacidad celular de reparación global del genoma (GGR) por NER, además, de la reparación por TCR. El término "Síntesis de ADN No Programada" se emplea para describir la síntesis de ADN que ocurre fuera de la fase S del ciclo celular, es decir, fuera de la replicación semiconservativa de ADN. En este caso, la replicación evaluada proviene del proceso de reparación por NER que involucra la eliminación de una secuencia de ADN conteniendo la lesión y la síntesis de un nuevo fragmento sano. Esta síntesis puede ser detectada por incorporación de H³-timidina en el ADN, inhibiendo previamente la replicación.

Para evaluar si la modificación en los niveles de p19 afectan la capacidad de las células de Leydig MA-10 de reparar su propio ADN, originamos en primer lugar, células MA-10 establemente transfectadas con el ADNc de p19 en dirección sentido (MA-10p19S) para sobreexpresar p19, ó antisentido (MA-10p19AS) para disminuir los niveles de p19. La expresión de p19 en estas células es inducible y conducida por el promotor de metalotioneína (MT) por estimulación con Zn²⁺, el cuál nos permite seleccionar el momento de "encendido y apagado" de la expresión de p19 o de su ADNc antisentido. Además, establecimos cultivos con el vector vacío para ser utilizados como controles. Luego del período de selección obtuvimos varios clones independientes que fueron amplificados. Para cada uno de estos clones evaluamos los niveles de ARNm de p19 por Northern blot luego de 4 horas de inducción por Zn²⁺ 75 µM. El resultado de este análisis, para el caso de las líneas que sobreexpresan p19, mostró que todos, exceptuando el clon 10, expresaron niveles similares de inducción de p19 (**Figura 9A**). Elegimos el clon 14 para los siguientes ensayos. En el caso de los clones que sobreexpresan el ARNm antisentido de p19 se observaron mayores diferencias. Mientras el clon 15 no pareció reducir los niveles de ARNm de p19, los clones 7 y 18 redujeron medianamente estos niveles, y los clones 1, 11, 17 y 21

redujeron el ARNm de p19 a niveles indetectables (**Figura 9B**). En este caso elegimos el clon 21 de p19 antisentido para continuar trabajando.

En el análisis por UDS, las 3 líneas seleccionadas fueron incubadas por 48 horas en medio con 1% de suero fetal bovino, y en medio libre de arginina, estas condiciones generan el arresto del ciclo celular necesario para cuantificar la incorporación de H³-timidina en los sitios de reparación sin interferencia de eventos de replicación. Durante las últimas 4 horas, las células fueron incubadas con Zn²⁺ con el objeto de inducir la expresión de p19 o p19 antisentido. Luego, las células fueron irradiadas con 8 mJ/cm² de UV e incubadas en medio con H³-timidina por 12 horas, momento en el cual fueron cosechadas y la incorporación de marca radiactiva cuantificada. Observamos que la línea MA-10p19S duplicó la incorporación de marca radiactiva en el ADN respecto de las células que contienen el vector vacío (MA10-empty), reflejando un aumento en la síntesis de ADN y consecuentemente en la capacidad de reparación de esta línea (**Figura 10A**). Por el contrario, la síntesis de ADN disminuyó significativamente en las células MA-10p19AS dañadas por UV. Es importante destacar que estos resultados no solo demuestran que la sobreexpresión de p19 mejora la capacidad de las células de reparar el ADN, sino también que los niveles endógenos de p19 son cruciales para alcanzar una respuesta completa al daño al ADN, indicado por la reducción significativa en la capacidad de reparación de la línea MA-10p19AS.

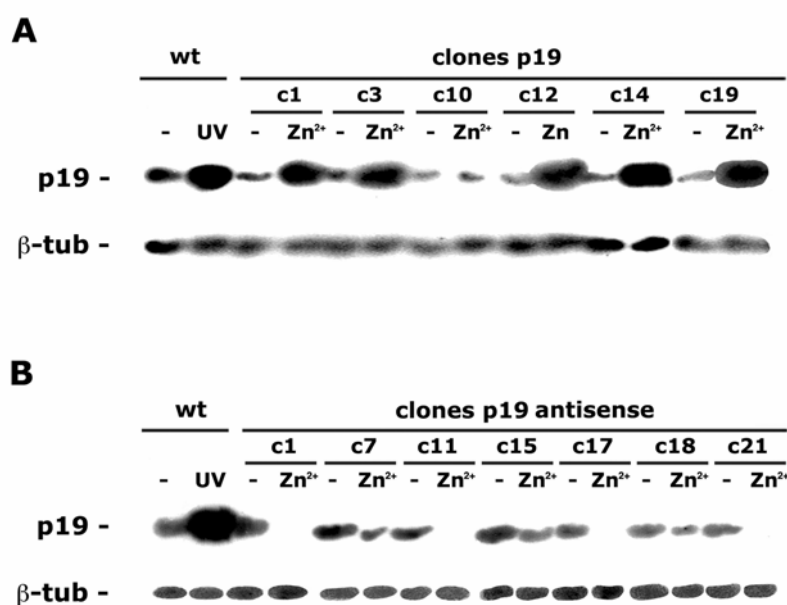


Figura 9. Análisis de la expresión de p19 en las líneas estables MA-10p19S y MA-10p19AS. (A) Análisis de la expresión de p19 en los clones individuales derivados de células MA-10 establemente transfectadas con un vector de expresión que codifica para p19 en dirección sentido (MA-10p19S) o antisentido (MA-10p19AS), bajo la regulación del promotor de metalotioneína. Las células provenientes de estos clones fueron incubadas con 75μM de ZnSO₄ durante 4 horas, fueron

cosechadas y el ARN total purificado analizado por Northern blot.

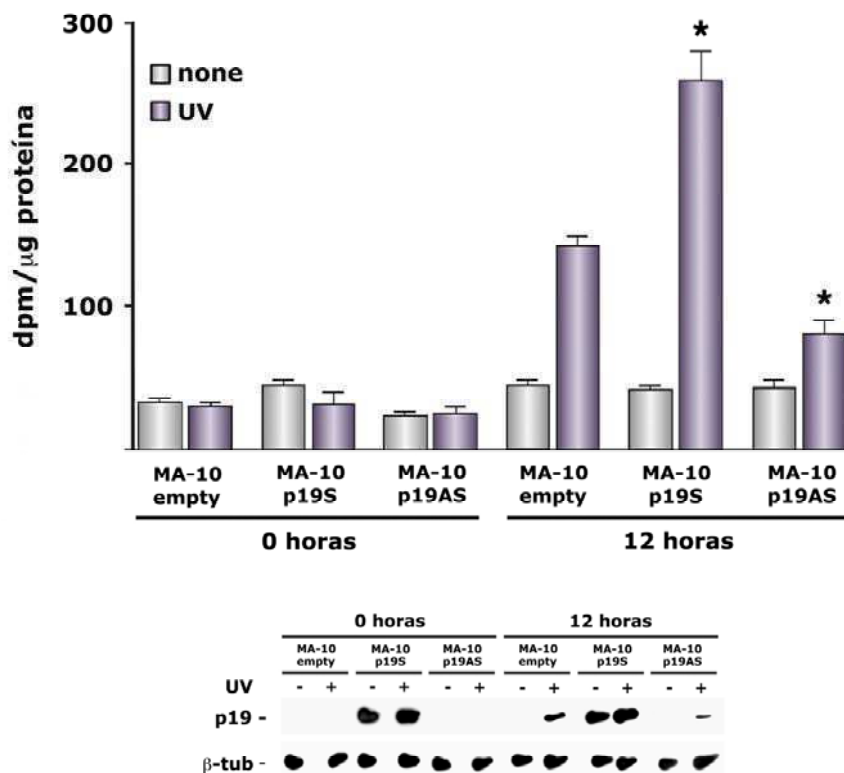
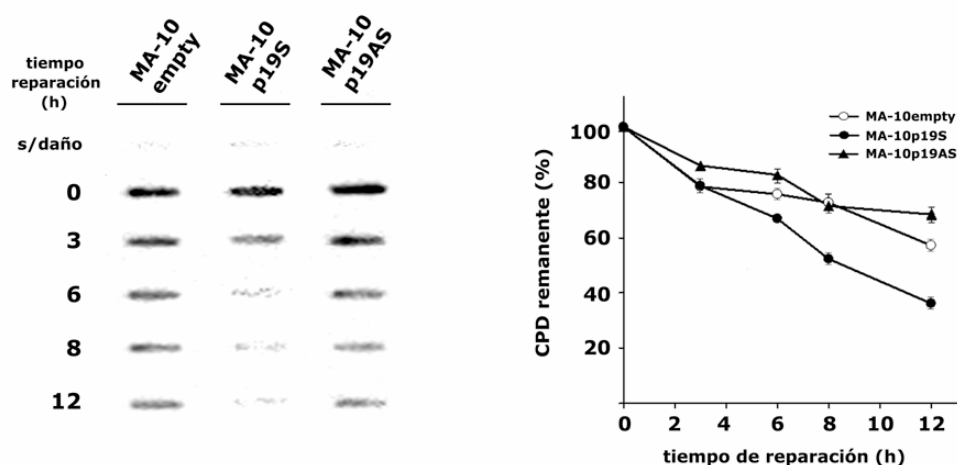


Figura 10. La capacidad de las células MA-10 de reparar el ADN es dependiente de los niveles de p19. Las líneas celulares indicadas fueron mantenidas en medio libre de arginina conteniendo 1% de suero fetal bovino durante 48 horas, e incubadas con 75 μM de ZnSO_4 durante las últimas 4 horas. Luego de este tiempo, las células fueron irradiadas con 8 mJ/cm^2 de UV, incubadas con 1 mCi [^3H]timidina y los lisados celulares analizados por ensayos de síntesis de ADN no programada (UDS) a diferentes tiempos. La figura muestra la media \pm S.E.M de los valores obtenidos en 3 ensayos independientes por triplicado. El Test de Student fue utilizado para comparar las muestras de MA-10p19S y MA-10p19AS tratadas con UV respecto a la línea transfectada establemente con el vector vacío, MA-10empty, a las 12 horas (* $P < 0,05$). ARN total fue purificado de las células irradiadas o no irradiadas y sujeto a Northern blot utilizando una sonda específica para p19 humano y β - tubulina. La figura es representativa de 3 ensayos independientes.

1.4.3 Análisis de reparación del ADN por remoción de CPDs

Para confirmar los resultados obtenidos con la aplicación de la técnica de UDS, utilizamos un método alternativo para evaluar la reparación global del genoma. Como fue mencionado con anterioridad, el daño por UV induce en el ADN lesiones del tipo dímeros de pirimidinas, entre otras, que son eliminadas por el mecanismo de reparación NER. Evaluamos ahora la capacidad de las células de eliminar estos dímeros de pirimidina (*cyclobutane pyrimidine dimers*, CPDs) utilizando un anticuerpo de reconocimiento específico para los dímeros formados entre timinas, o entre timinas

y citosinas. Empleamos las 3 líneas estables ya descritas para determinar la capacidad, que tiene cada una de ellas, en la remoción de CPDs en función del tiempo. Los clones estables derivados de células MA-10 fueron incubados por 4 horas con Zn^{2+} , irradiados con una dosis de UV de $8mJ/cm^2$ y luego incubados a diferentes tiempos para permitir la reparación. El ADN de las células dañadas fue aislado y examinado para determinar la presencia de lesiones CPDs por inmunoslot blot, usando un anticuerpo específico para las estructuras mencionadas. La cantidad inicial de daño, determinada por la banda del tiempo cero en las muestras irradiadas, fue aproximadamente igual en las 3 líneas celulares evaluadas. Observamos que, en las células MA-10empty, el 40% del daño inicial resulta removido luego de 12 horas de generado. Por su parte, en la línea MA-10p19S se observa una tasa de reparación llamativamente más veloz, alcanzando el mismo nivel de reparación 4 horas antes que la línea control (**Figura 11 A y B**). Por el contrario, la línea MA10p19AS presentó una tasa de reparación menor, manteniendo un 68% del daño inicial luego de 12 horas. En este mismo tiempo, las células control disminuyeron los niveles de daño a un 58%, y la línea con sobreexpresión de p19 observó la mayor tasa de reparación con un 38%



remanente del daño inicial.

Figura 11. p19 es necesaria para una eliminación más eficiente de las lesiones CPD. Se evaluó la presencia de lesiones CPD en líneas celulares MA-10empty, MA-10S ó MA-10p19AS. Las células fueron incubadas por 4 horas en medio con $75 \mu M$ de $ZnSO_4$ antes de la irradiación UV y mantenidas en este medio hasta que las muestras fueron recolectadas. El ADN de las células dañadas fue aislado a los tiempos indicados y examinados para la presencia de lesiones CPD por inmunoslot-blot usando un anticuerpo específico para estas estructuras. El panel izquierdo muestra una fotografía representativa de tres experimentos independientes con resultados similares y el panel derecho indica el porcentaje de lesiones CPD que permanecen en las muestras a los tiempos indicados. La figura muestra la media \pm S.E.M de los valores obtenidos en 3 ensayos independientes.

1.4.4 Ensayo del Cometa

Por último, en esta serie de estudios realizados para establecer la participación de p19 en los mecanismos de reparación del ADN, utilizamos el Ensayo del Cometa (Comet Assay). Este ensayo permite estudiar reparación del ADN a nivel de células individuales empleando la variante denominada “ensayo del cometa a pH alcalino”. Luego de radiación UV roturas simple cadena ocurren en el ADN como parte del proceso de reparación de la vía NER. Este mecanismo de reparación implica la incisión a cada lado de la lesión, la remoción de una simple hebra de 24-32 nucleótidos de largo conteniendo el daño y la reconstitución de la doble hebra por la ADN polimerasa (Sancar et al., 2004). A tiempos cortos, la radiación UV no produce directamente roturas simple o doble cadena, por lo tanto el largo de los cometas refleja el nivel de las roturas de cadena asociadas a la escisión del daño y dan cuenta del nivel de reparación.

Brevemente, el ensayo del Cometa consiste en preparar una suspensión de células en agarosa de bajo punto de fusión y construir, con esta suspensión, minigeles sobre portaobjetos. Las células contenidas y fijadas en los minigeles son lisadas en condiciones de alta concentración salina de modo de permitir la liberación del ADN. Luego, los minigeles son sujetos a incubación en condiciones alcalinas (pH aproximado a 12,1) para permitir el desenrollamiento y desnaturalización del ADN y la liberación de las roturas simple cadena. El siguiente paso consiste en realizar una electroforesis en condiciones también alcalinas para impulsar la migración de los extremos de las roturas simple cadena. Finalizada la electroforesis, los minigeles son neutralizados y teñidos (con bromuro de etidio, por ejemplo) para ser evaluados por microscopía de fluorescencia. Las células luego de concluido este proceso, tienen la apariencia de un cometa, asemejando la región nuclear de la célula a la cabeza y la cola del cometa a la región conteniendo las hebras simple cadena que migraron en la electroforesis.

Para evaluar el efecto de p19 sobre la reparación a nivel de células individuales por ensayo del cometa, se utilizaron las líneas estables MA-10p19empty, MA10p19S y MA10-p19AS. Las células fueron incubadas con Zn^{2+} por 4 horas antes de generar el daño y, a diferentes tiempos post UV, se recolectaron muestras de cada línea celular. Aproximadamente 10.000 células por muestra fueron embebidas en agarosa de bajo punto de fusión para generar los minigeles. Luego de la desnaturalización de las hebras de ADN en solución alcalina, la electroforesis procedió por 20 minutos. Los minigeles fueron lavados con una solución de neutralización y teñidos con bromuro de etidio. Las fotos tomadas fueron analizadas por el programa CASP (*Comet Asssay Software Project*) que evalúa varios parámetros de los cometas, entre ellos el llamado

“Momento de la Cola” (Tail Moment). El momento de la cola es definido como el producto entre el largo de la cola y la fracción del ADN total en la misma. El valor de este parámetro se relaciona con la capacidad de reparación, cuánto mayor sea el momento de la cola, mayores los niveles de reparación del ADN en la célula evaluada.

Los resultados en la **Tabla 1** muestran que luego de 45 minutos de daño por UV, las células sobreexpresando p19, MA-10p19S, observaron un aumento de 2,7 veces en el momento de la cola en contraste con las células control MA-10empty. Estos valores indican un nivel de reparación más eficiente de las células MA-10p19S. La línea pMTp19AS mostró una disminución leve pero significativa en el momento de la cola en el mismo tiempo. Aún más, el 90% de las células analizadas para la línea MA-10p19S a los 45 minutos de aplicado el daño, muestran valores significativamente mayores que los observados para el tiempo 0, en comparación con el 38% y el 46% para las células MA-10empty y MA-10p19AS.

Nuevamente, estos resultados contribuyen con la hipótesis que postula a p19 como participante en los mecanismos involucrados en la reparación de ADN por luz UV. En la **Figura 12** se observan fotografías representativas de los resultados expresados en la Tabla 1.

Tabla 1. *Momento de la cola de las líneas celulares MA-10 dañadas*

Línea Celular	Tiempo luego de la radiación UV		
	0	45	90
MA-10empty	5.7 ± 0.38	9.9 ± 0.68	10.1 ± 0.50
MA-10p19S	4.9 ± 0.40	27.4 ± 0.88 *	9.0 ± 0.54
MA-10p19AS	5.4 ± 0.34	7.5 ± 0.44 *	7.1 ± 0.4

Los resultados representan la media + S.E.M.
Se analizaron 100 células / minigel en tres minigeles por tratamiento.
El test de Student fue utilizado para comparar las líneas MA-10p19S y MA-10p19AS con MA-10empty (* p < 0.01)

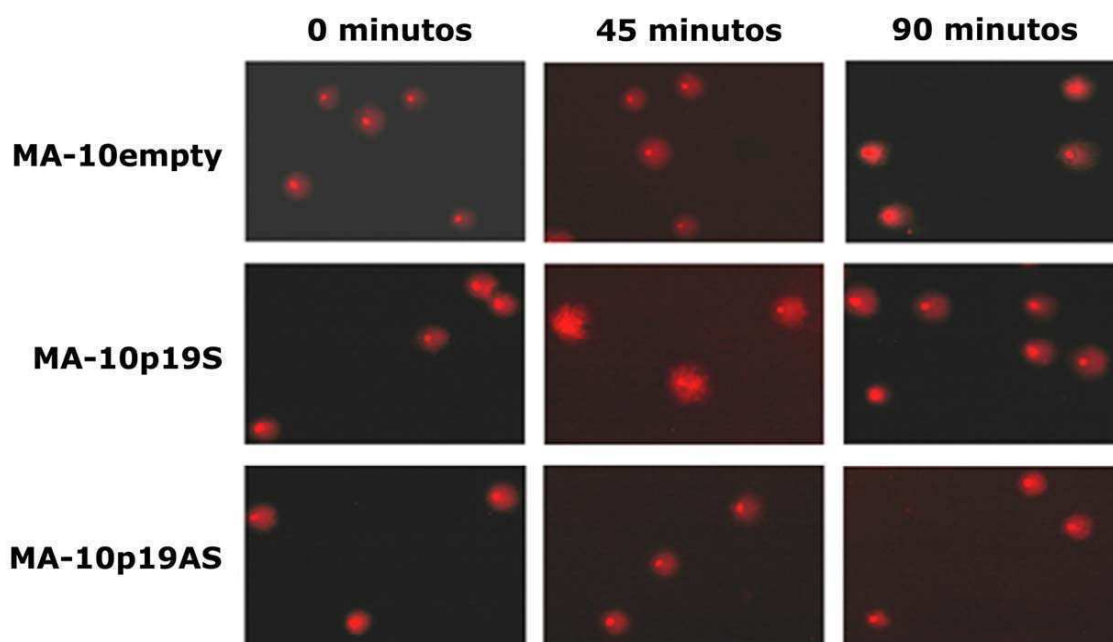


Figura 12. Análisis de la capacidad de reparación del ADN de las líneas MA-10p19S y MA-p19AS por ensayo del Cometa. Las células fueron plaqueadas en cajas de 35 mm, incubadas con 75 μM de ZnSO_4 por 4 horas y luego dañadas por UV. A diferentes tiempos luego del daño, muestras de cada línea celular fueron recolectadas y 10.000 células por muestra fueron embebidas en agarosa *Low Melting* generando un minigel. El nivel de roturas simple cadena asociado a la reparación del ADN fue evaluado a diferentes tiempos por el ensayo del cometa. Los cometas fueron evaluados por microscopía de fluorescencia. Las fotos tomadas fueron analizadas por el programa CASP.

1.5 p19 confiere mayor resistencia a la irradiación por UV

Los resultados descriptos hasta ahora sugieren que p19 estaría involucrada en la capacidad de las células de reparar eficientemente el ADN luego de daño por UV tanto en la reparación por las vías TC-NER como por GG-NER. Hemos mencionado, además, que la respuesta celular al daño consiste, primariamente, en activar mecanismos de reparación del genoma con el propósito de eliminar las lesiones. Sin embargo, dependiendo de la extensión del daño inflingido y de la capacidad de la célula de repararlo, se activan simultáneamente mecanismos de muerte de modo de eliminar, de forma directa, la célula afectada. Postulamos entonces que, si p19 desempeña una función en los mecanismos de reparación, variaciones en los niveles de p19 afectarían la supervivencia celular al daño genotóxico.

Para estudiar si la regulación positiva o negativa de p19 tiene algún significado biológico y juega un rol funcional en la respuesta celular a la injuria genotóxica,

analizamos en primer lugar la supervivencia celular en las líneas estables mediante el ensayo de MTT (Bromuro de 3-[4,5 dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolio). Brevemente, este es un ensayo colorimétrico que cuantifica la reducción del MTT por la mitocondria de células viables en cristales insolubles de color morado. El color es evaluado por espectrofotometría y se obtiene una relación lineal entre el número de células y la absorbancia medida. También puede ser empleado para evaluar muerte celular mediada por agentes dañadores del ADN (Plumb, 2004).

En este ensayo evaluamos la viabilidad celular durante varios días luego de la aplicación de luz UV, como forma de estimar proliferación celular luego de daño genotóxico. Para inducir la expresión de p19 en dirección sentido y antisentido, y así modular los niveles de p19, el Zn^{2+} fue agregado al medio de cultivo 4 horas antes de irradiar con UV y hasta 24 horas posteriores al daño. Cumplido este tiempo la inducción fue detenida para evitar que la sobreexpresión de p19 arrestara las células en la fase G1 e impidiera la proliferación. Consideramos que de existir un efecto de p19 sobre la supervivencia celular éste estaría dado por la capacidad de reparación del daño en las primeras horas de generado, momento en el cual esta proteína cumpliría su función.

En primer lugar, descartamos cualquier efecto deletéreo del $ZnSO_4$ sobre la viabilidad celular (**Figura 13A**, línea MA-10 empty y MA-10 empty+ $ZnSO_4$). Por otro lado, comparamos la proliferación de las líneas celulares entre sí, encontrando que cada una de ellas tienen diferente potencial de proliferación (**Figura 13A**). La línea MA-10p19AS tiene una tasa de proliferación mayor que la línea control. Contrariamente, la tasa de proliferación en la línea MA-10p19S es significativamente menor que la línea MA-10empty. Estas diferencias pueden explicarse teniendo en cuenta la función inhibitoria de p19 sobre CDK4/6, la sobreexpresión de p19 actuaría inhibiendo la proliferación celular mientras que la disminución en la expresión de p19 ejercería el efecto inverso.

Finalmente analizamos la capacidad de estas tres líneas de sobrevivir y proliferar luego del daño (**Figura 13B**). Observamos que a partir del día 3 post UV el número relativo de células viables de la línea MA-10p19S es significativamente mayor a los valores hallados para las células MA-10empty y, además, esta diferencia es mantenida hasta el último día del ensayo. Podemos notar que, luego de 6 días de aplicado el tratamiento, las células MA-10p19S presentan un aumento en el número de células viables del 21% respecto de las células de la línea control. Por otro lado, la línea MA-10p19AS resultó significativamente más sensible al daño que las células control. Al igual que en la línea MA-10p19S, desde el tercer día post-daño se muestran diferencias significativas respecto a las células MA-10empty, alcanzando en el día 6 un

número relativo de células viables 20% menor. A partir de estos resultados podemos describir un efecto “protector” de p19 sobre la viabilidad celular post daño, observando no solo que la sobreexpresión de p19 mejora sensiblemente este parámetro sino que también los niveles endógenos de esta proteína ejercen un efecto positivo sobre la supervivencia. Si bien, en la línea MA-10empty los niveles de p19 son inducidos por efecto de la irradiación UV, las diferencias observadas con la línea MA-10p19S resaltan la capacidad de resistencia que confiere la presencia de altos niveles de p19 en el momento de la injuria.

Estos datos resultan aún más llamativos al recordar que en ausencia de daño, las 3 líneas celulares tienen diferentes tasas de proliferación, siendo MA-10p19S la de proliferación más lenta.

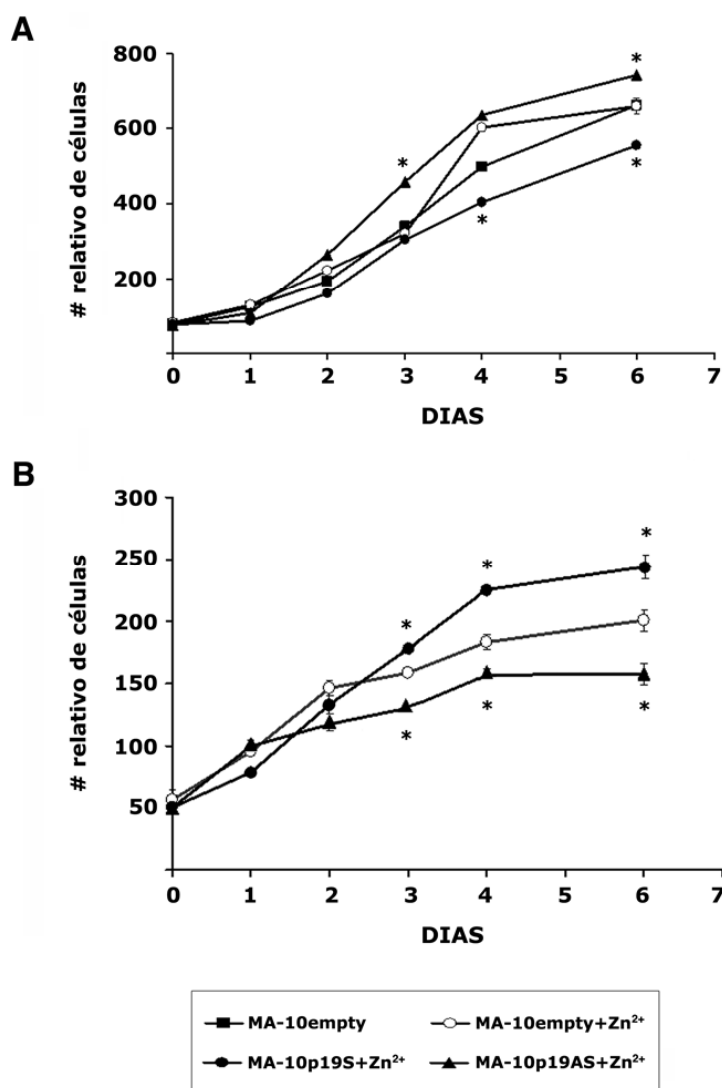


Figura 13. La viabilidad luego de daño por UV está influenciada por los niveles de p19 en la célula. La viabilidad celular fue evaluada en células MA-10p19S, MA-10p19AS y MA-10empty durante 6 días sin daño (A) y luego de irradiación con UV (4 mJ/cm²) mediante análisis de MTT (B). Cada punto representa el promedio ± S.E.M. de 3 experimentos diferentes hechos por quintuplicado. En (A y B) el test de Student fue utilizado para comparar las células MA-10p19S ó MA-10p19AS con MA-10empty (* P<0,01).

Para analizar en mayor profundidad los efectos a largo plazo y la relevancia fisiológica de p19 en la supervivencia celular se emplearon las diferentes líneas celulares en ensayos clonogénicos. El ensayo clonogénico se utiliza para evaluar supervivencia celular y se basa en la habilidad de una única célula de generar una colonia de por lo menos 50 células. Este método permite estudiar muerte celular causada por un amplio número de agentes citotóxicos. Las células tratadas y diluidas adecuadamente son incubadas de 1 a 3 semanas para permitir la formación de las colonias (Franken et al., 2006).

En primer lugar evaluamos si el $ZnSO_4$, utilizado para inducir el promotor de metalotioneína, modificaba la capacidad de las células de formar colonias (**Figura 14A**). No observamos ninguna diferencia significativa entre las células tratadas con $ZnSO_4$ indicando que las tres líneas celulares poseen capacidad similar de formar colonias bajo estas condiciones.

El protocolo de agregado de $ZnSO_4$ fue igual al utilizado para medir los ensayos de viabilidad y proliferación celular por MTT. Se emplearon diferentes dosis de radiación UV, entre 1 y 8 mJ/cm^2 , y las células fueron crecidas por un período de 10 días antes del análisis. Lo primero que podemos observar es que la irradiación con dosis crecientes de UV produjo una disminución en la capacidad formadora de colonias en las 3 líneas celulares indicando, como era de esperar, toxicidad celular significativa del dañador utilizado (**Figura 14B**). En cuanto a las curvas de respuesta a diferentes dosis de UV de las líneas celulares vemos que difieren significativamente dependiendo de los niveles de p19 expresados en cada una. Claramente, lo primero que podemos notar es la diferencia significativa en la sobrevivencia entre la línea celular MA-10p19S y MA-10p19empty luego de ser irradiadas con 4 mJ/cm^2 de luz UV. Mientras que la línea MA-10p19empty conserva un valor de sobrevivencia del 38%, este aumenta a un 63% en la línea MA-10p19S. De estos resultados podemos concluir que la muerte celular es reducida significativamente en las células que al momento del daño expresan p19 en altos niveles. Sumado a estos resultados, podemos también observar que las células deficientes en p19 al momento de producir la lesión disminuyen abruptamente, casi en un 80%, su resistencia a la luz UV aún a la dosis más baja ensayada.

Todos los resultados descriptos en este punto indican que los niveles de p19 influyen la sensibilidad de las células al daño por radiación UV, y que la presencia de p19 confiere una ventaja notable en la resistencia al estrés genotóxico.

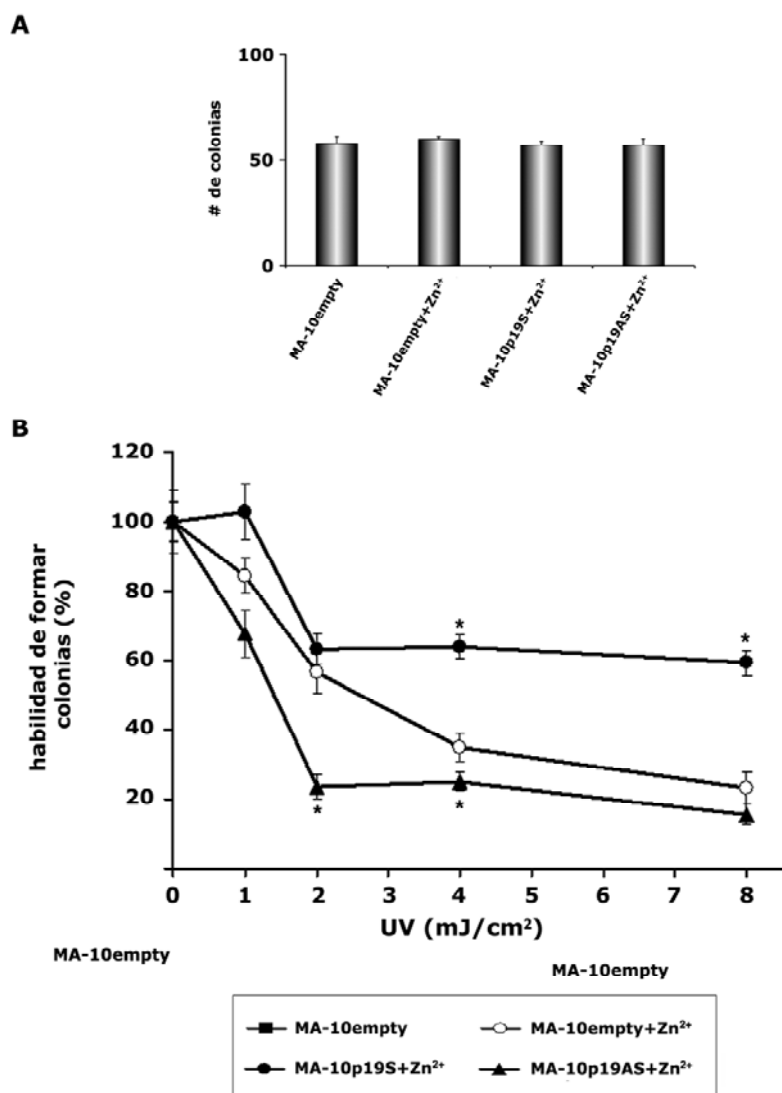


Figura 14. La supervivencia luego de daño por UV está influenciada por los niveles de expresión de p19. La viabilidad celular por ensayo clonogénico fue evaluada en células MA-10p19S, MA-10p19AS y MA-10empty durante 10 días con o sin tratamiento de ZnSO₄ (A) ó con tratamiento de ZnSO₄ y después de la irradiación con diferentes dosis de UV (B). En B Los resultados están expresados como porcentaje del número de colonias con respecto a las células no tratadas, el cual fue establecido con el valor de 100. Cada punto representa el promedio ± S.E.M. de 3 experimentos independientes por sextuplicado. Test de Student (*P<0,01).

1.6 La deficiencia de p19 aumenta la frecuencia de aberraciones cromosómicas

La estabilidad genómica es de fundamental importancia para la supervivencia y para la ejecución de las funciones vitales de todos los organismos. Fallas en el funcionamiento de los procesos que normalmente mantienen la integridad del genoma pueden conducir a la generación de aberraciones cromosómicas y aumentar la predisposición al cáncer. Las aberraciones cromosómicas se generan cuando el ADN por alguna causa, como puede ser la acción de un agente genotóxico, sufre roturas en diferentes puntos y los extremos de estas roturas se unen defectuosamente dando patrones diferentes a su arreglo original. Estas estructuras aberrantes se hacen evidentes cuando la célula progresa a través de la fase S y la mitosis. La evaluación de los cromosomas en metafase pueden revelar varios tipos de estructuras diferentes, como los cromosomas dicéntricos o trirradiales, intercambios entre cromátides o entre cromosomas, cromosomas en forma de anillos, roturas cromosómicas y puentes cromosómicos, entre otras (Chipchase and Melton, 2002).

Hasta aquí fue demostrado que p19 participa de la reparación eficiente del daño por UV y que la supervivencia celular se correlaciona con los niveles de p19 al momento de la injuria. Ahora planteamos que si p19 cumple una función en la reparación del ADN, las líneas celulares que expresen esta proteína tendrán, además, una mayor capacidad para mantener la integridad del genoma.

Para estudiar este punto realizamos un análisis cromosómico, en las 3 líneas celulares derivadas de MA-10 y que expresan niveles aumentados, deficientes o normales de p19, luego de la irradiación con luz UV. Se evaluaron las siguientes características: el número de metafases con aberraciones, el número total de aberraciones, el número de aberraciones cromosómicas por metafase y finalmente el número de metafases con alto nivel de daño (con más de 5 estructuras aberrantes). Este estudio fue realizado en colaboración con la Dra. Marcela González Cid, integrante del Instituto de Investigaciones Hematológicas de la Academia Nacional de Medicina.

De los resultados obtenidos podemos concluir que, luego del daño, en las células MA-10p19AS el porcentaje de metafases con aberraciones (principalmente roturas e intercambio entre cromátides y cromosomas) es un 20% más alto en comparación con la línea MA-10empty (**Tabla 2**). La sensibilidad más elevada de las células MA-10p19AS fue notoria no sólo en la mayor cantidad de células anormales sino también en la cantidad total de aberraciones cromosómicas. Por el contrario, las

células MA-10p19S irradiadas con UV muestran una disminución del 23% en el número de metafases aberrantes en relación con las células MA-10empty control (**Tabla 2**).

Es interesante destacar que las células que tienen niveles de p19 reducidos muestran un 50% más de metafases con aberraciones como de aberraciones totales, en claro contraste con las células que expresan niveles altos de p19 al momento del daño. Más aún, el número de células con alto nivel de daño (más de 5 aberraciones por metafase) es un 33% más alto en la línea MA-10p19AS respecto a MA-10p19S. Es importante destacar que las células dañadas fuertemente son eliminadas diferencialmente por apoptosis, y dado que, luego de la exposición a UV las células MA-10p19AS son mas sensibles a la muerte celular, es lógico pensar que la cantidad de aberraciones cromosómicas observadas en estas células esta subestimadas y por lo tanto las diferencias observadas entre las líneas celulares pueden ser aún mayores.

La sensibilidad de las células MA-10p19AS a la radiación UV indica que estas células no son capaces de mantener correctamente la integridad del genoma. Esta evidencia sugiere que, aun en ausencia de agentes externos, la estabilidad del genoma en esta línea podría estar afectada. Analizamos, entonces, la frecuencia de aberraciones cromosómicas en las 3 líneas en ausencia de factores dañadores externos. El análisis citogenético reveló un nivel de metafases con aberraciones cromosómicas espontáneas en la línea MA-10p19AS que casi alcanza un 50% más que el encontrado para la línea control (Tabla 2).

Para concluir, en nuestra opinión estos datos muestran un efecto aún más interesante de p19 demostrando que la expresión de esta proteína es esencial para mantener la estabilidad cromosómica y consecuentemente la integridad global del genoma.

Tabla 2. Frecuencia de Aberraciones Cromosómicas

Línea Celular	UV mJ/cm	Metafases con Aberraciones (%) ^a	Aberraciones Totales	Aberraciones por Metafase ^b	Células con alto Daño ^c
MA-10empty	-	19(6)	22	0.073 ± 0.005	0
MA-10p19S	-	15(5)	26	0.086 ± 0.008	0
MA-10p19AS	-	26(9)	33	0.110 ± 0.005*	2
MA-10empty	8	180(60)	339	1.130 ± 0.170	41
MA-10p19S	8	141(47)	265**	0.883 ± 0.154	35
MA-10p19AS	8	215(72)	413**	1.377 ± 0.343	49

^a Cada valor fue obtenido en el análisis de 300 metafases.

^b media ± S.E.

^c Células con mas de cinco aberraciones (roturas, intercambios, etc).

* test de Student (p>0.01)

** Wilcoxon test (p<0.033)

En la **Figura 15** se muestran fotografías representativas de los resultados expresados en la Tabla 2

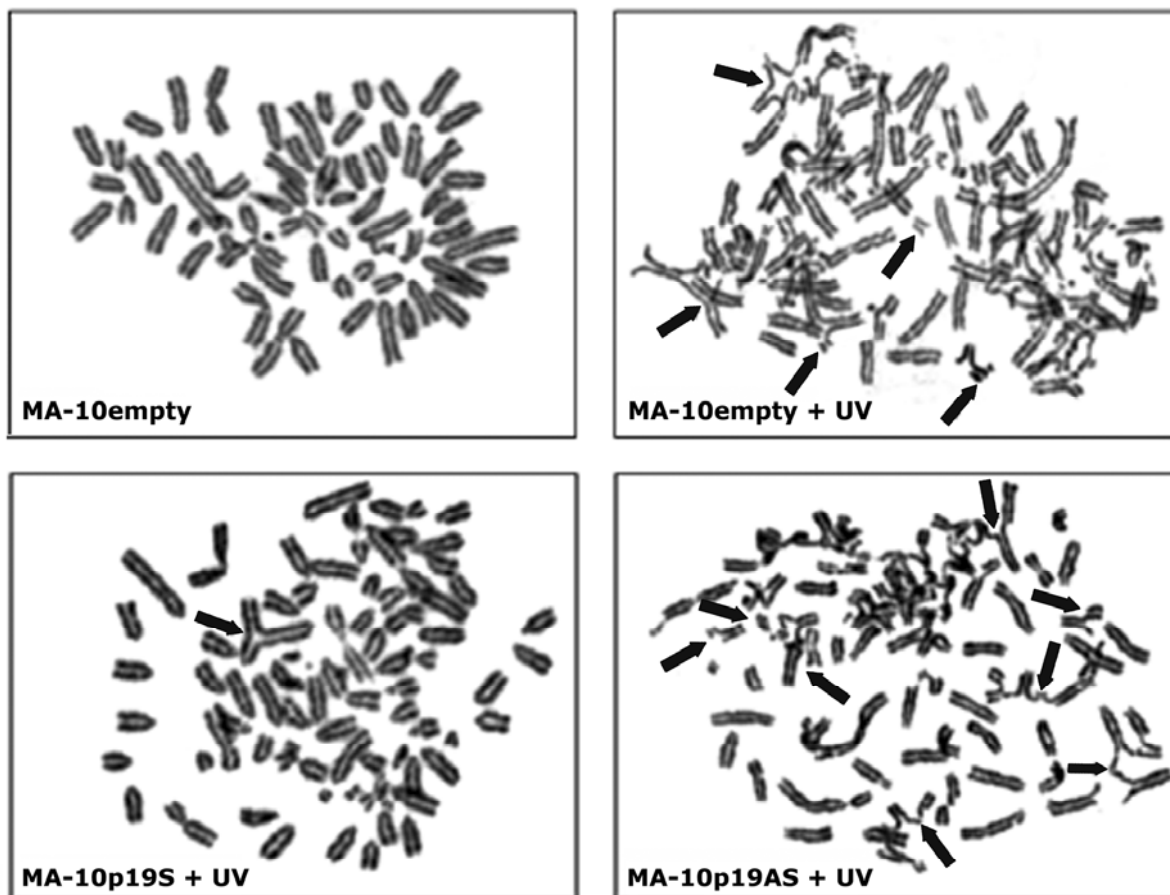


Figura 15. p19 en el mantenimiento de la integridad del genoma. Se muestran las metafases de células no irradiadas (MA-10 empty) o irradiadas (UV) de las líneas celulares clonales expresando diferentes niveles de p19. La inducción del promotor de metalotioneína fue iniciada 4 horas antes del daño por UV. Cuarenta y ocho horas después del daño, las células fueron arrestadas en metafase con colchicina, fijadas, y visualizadas por tinción con Giemsa. Las flechas indican diferentes tipos de aberraciones cromosómicas.

1.7 p19 participa de la reparación del ADN en forma independiente de su función inhibitoria del ciclo celular

p19, al igual que los otros miembros de la familia INK4, se une a las quinasas CDK4 o CDK6 inhibiendo la progresión del ciclo celular cuando es sobreexpresada. Por otro lado, la reparación del ADN requiere de tiempo suficiente para eliminar el daño. Entonces es lógico pensar que la sobreexpresión de p19 al conducir a la inhibición de la proliferación permitiría aumentar el tiempo de reparación y consecuentemente la eficiencia de la reparación.

Para evaluar este punto, utilizamos un aminoácido vegetal llamado mimosina que arresta los cultivos celulares en un punto discreto de la fase G1 tardía. En principio evaluamos la efectividad de este inductor para arrestar el ciclo celular realizando un análisis de incorporación de ³H-timidina (**Figura 16A**). Células MA-10 fueron transfectadas con un vector de expresión para p19 o tratadas con mimosina por un período de 24 h. Como se puede observar, la mimosina tiene la capacidad de inhibir el ciclo celular al mismo nivel que p19. Si la sobreexpresión de p19, entonces, mejora la reparación debido a permitirle a las células mayor tiempo de reparación, mimosina, al imitar el efecto inhibitorio de p19, debería alcanzar los mismos niveles de reparación. Para estudiar este punto realizamos ensayos de HCR (**Figura 16B**). Podemos ver que mimosina, a pesar de inhibir la proliferación celular al igual que p19, no aumenta los niveles de reparación del ADN significativamente. En este sentido, mimosina no imita el efecto de p19 sobre la reparación.

Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de p19 mejora la reparación del ADN dañado por UV por un mecanismo diferente de aquella función relacionada con la inhibición del ciclo celular.

Si esta hipótesis es correcta, es lógico pensar que p19 no requeriría de la interacción con CDK4 para ejercer su función sobre la reparación. Para probar esta cuestión se realizaron ensayos de HCR en células MA-10 co-expresando CDK4 salvaje o una versión mutante CDK4R24C y un vector de expresión de p19 (**Figura 17**). Esta mutante de CDK4 tiene una mutación puntual (el cambio de arginina por cisteína en la posición 24) en el primer exón codificante, dando expresión a una proteína con actividad quinasa completa pero sin capacidad de unión a las proteínas INK4, y en consecuencia no pudiendo ser inhibida (Sotillo et al., 2001).

Analizando los resultados observamos que, cuando p19 es expresada junto con CDK4 salvaje, la habilidad de esta INK4 de aumentar la reparación del ADN se ve significativamente disminuida. CDK4 salvaje actuaría en este caso secuestrando p19 e

impidiendo su función en la reparación. Por otro lado, cuando p19 es co-expresada con la mutante CDK4R24C, se observan valores de reactivación del gen reportero CAT significativamente mayores al tratamiento control sin p19, similares a los encontrados para la sobreexpresión de p19 sola.

Estos resultados proponen un mecanismo por el cual p19 participaría en la reparación del ADN de forma independiente de la interacción con CDK4 y consecuentemente de modo independiente de su función como inhibidor del ciclo celular (en la **Figura 40** se profundiza en este estudio).

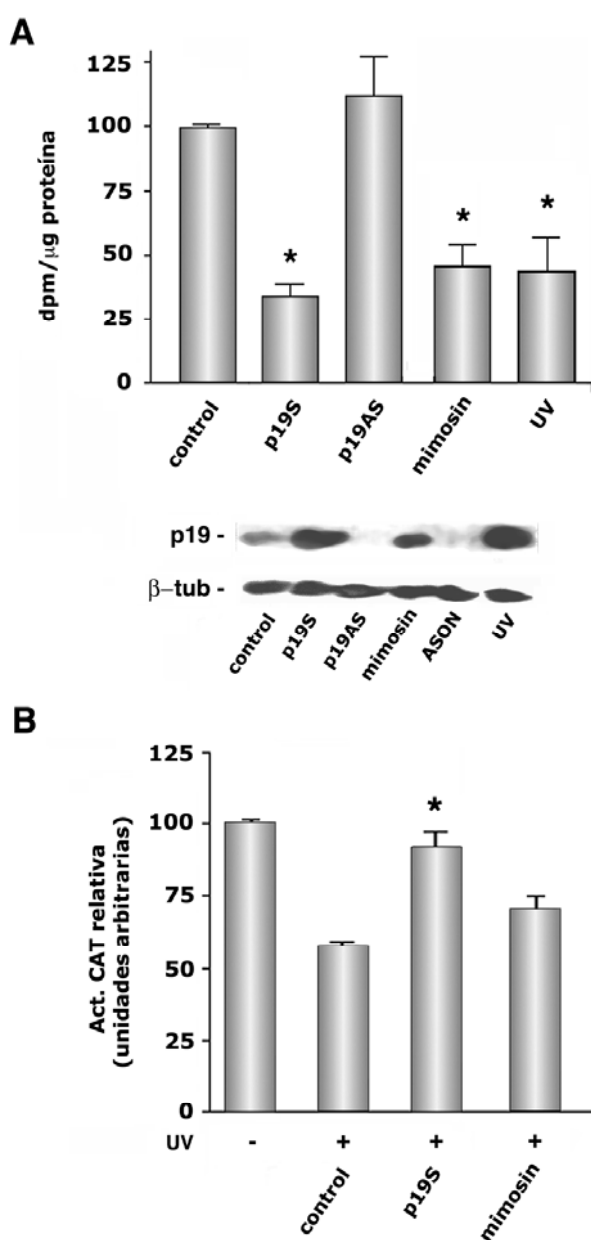


Figura 16. p19 participa en la reparación del ADN independientemente de su función inhibitoria del ciclo celular. (A) Mimosina imita el efecto de la sobreexpresión de p19 en el arresto celular. Células MA-10 fueron transfectadas con 2 μg del vector de expresión codificando p19 en dirección sentido (p19S) o antisentido (p19AS) o un oligonucleótido antisentido de p19 (ASON, 2 mM) junto con 0,5 μg de puroBABE. Luego de 24 horas fueron seleccionadas con puromicina. 24 horas más tarde 500 μM de mimosina fue agregada en los tratamientos indicados y la incubación procedió por 24 horas más en presencia de puromicina. Todos los cultivos fueron incubados con 1 μCi [³H]timidina y su incorporación evaluada 6 horas más tarde. Las barras representan la media ± S.E.M. de 3 experimentos hechos por duplicado. El ARN total fue extraído de los cultivos señalados y sujeto a Northern blot. **(B)** Ensayo de HCR. Células MA-10 fueron transfectadas con el plásmido pCMVCAT y co-transfectadas con un vector de expresión para p19 en dirección sentido (p19S, 4 μg) ó incubada con 500 μM de mimosina por 24 horas. Los resultados están expresados como la actividad relativa de CAT con respecto al vector reportero no dañado, el cual fue establecido con un valor de 100. El test de Student fue utilizado para

comparar los diferentes tratamientos con las células control no tratadas (*P<0,05).

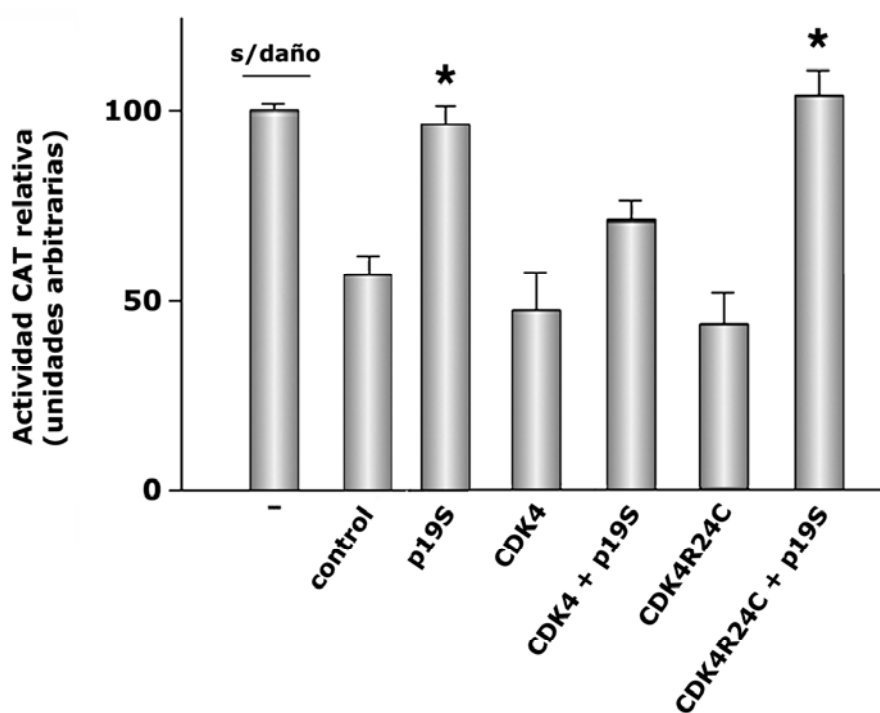


Figura 17. p19 participa en la reparación del ADN independientemente de su función como regulador del ciclo celular. Células MA-10 fueron transfectadas con 4 μ g de plásmido pCMVCAT dañado o no dañado (32 mJ/cm²) y co-transfectado con un vector de expresión codificando para p19 en dirección sentido (p19S, 4 μ g) y/o CDK4 (4 μ g), y/o CDK4R24C (4 μ g) como se indica en la figura. La actividad CAT fue medida 48 horas luego de la transfección. Los resultados están expresados como la actividad relativa de CAT con respecto al vector reportero no dañado, el cual fue establecido con un valor de 100. El test de Student fue utilizado para comparar las muestras co-transfectadas con alguna versión de CDK4 y p19S con las muestras transfectadas solo con la CDK4 respectiva (*P<0,05).

Capítulo 2: Mecanismo de activación de p19INK4d frente a daño genotóxico.

Las modificaciones post-traduccionales juegan un papel importante en la coordinación de la respuesta celular al daño en el ADN. Evidencias recientes sugieren una interacción entre múltiples modificaciones, incluyendo fosforilación, ubiquitinación, acetilación y sumoilación, las cuales se combinan para propagar la señal del daño y ejecutar el arresto del ciclo celular, la reparación del ADN, la apoptosis y la senescencia (Bode and Dong, 2004; Toledo and Wahl, 2006). Modificaciones post-traduccionales específicas permiten un control temporal y espacial sobre la relocalización, interacción y la activación o inhibición de funciones proteicas. Estas modificaciones permiten además la amplificación de la señal del daño que constituye un paso necesario para el mantenimiento de la estabilidad genómica.

Hasta aquí hemos demostrado que p19 tiene una función, no relacionada con la inhibición del ciclo celular, involucrada en la respuesta celular al daño ejecutada frente al tratamiento con UV como agente genotóxico.

Como hemos mencionado con anterioridad en la introducción de este trabajo, se ha descrito que la respuesta al daño al ADN está mediada por una cascada de señales conducida principalmente por eventos de fosforilación de la que participan proteínas sensoras, mediadoras, transductoras y efectoras de la respuesta.

En esta segunda parte del trabajo planteamos que, si p19 presenta una función ligada al mantenimiento de la estabilidad del genoma, formando parte de la respuesta celular al daño al ADN, entonces es posible que esta función esté regulada por modificaciones post-traduccionales como los eventos de fosforilación. En este segundo capítulo enfocamos el estudio sobre p19 en este sentido.

2.1 p19 es fosforilada en respuesta al daño genotóxico

Un trabajo reciente basado en técnicas de proteómica a gran escala ha identificado más de 700 proteínas que resultan fosforiladas en respuesta al daño. Estos resultados revelan una red intrincada de proteínas que es orquestada y regulada por este tipo de modificación post-traducciona (Matsuoka et al., 2007). Con el objeto de determinar si p19 pertenece a esta red de proteínas evaluamos, en primer lugar, si es fosforilada *in vivo* en respuesta a la acción de diversos genotóxicos. Para ello, se realizaron ensayos de marcación metabólica.

El estudio fue conducido en la línea celular humana WI-38 utilizando tres tipos de agentes genotóxicos diferentes: luz UV, péptido β -amiloide y cisplatino. Las células fueron incubadas por 3 h con ^{32}P -ortofosfato de sodio, de modo de asegurar la síntesis de ^{32}P -ATP, y luego dañadas con los diferentes agentes genotóxicos. Se tomaron muestras a diferentes tiempos posteriores al daño y, en cada una de ellas, p19 fue inmunoprecipitada por medio de un anticuerpo monoclonal específico. Los inmunoprecipitados fueron resueltos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante y el gel expuesto a pantallas de almacenamiento de fósforo (*storage phosphor screens*). La imagen fue obtenida a través de la utilidad Storm Phosphoimager Scanner.

A partir de la imagen resultante (**Figura 18**), podemos decir que p19 en condiciones basales, en ausencia de daño, no se fosforila, al menos en niveles detectables. Sin embargo, cuando las células son expuestas a radiación UV, ó incubadas con cis-platino, ó con péptido β -amiloide observamos, efectivamente, que p19 es fosforilada en todos los tiempos ensayados y al menos hasta las 8 horas posteriores al daño se observa fosforilación.

En vista de la fosforilación de p19 luego del tratamiento con diversos genotóxicos y dado que las respuestas al daño al ADN se activan rápidamente con el objeto de eliminar la lesión, realizamos ensayos similares pero a tiempos más cortos (**Figura 19**). En estos ensayos podemos observar que p19 resulta fosforilada al menor tiempo estudiado correspondiente a 20 minutos, luego de dañar los cultivos celulares con UV.

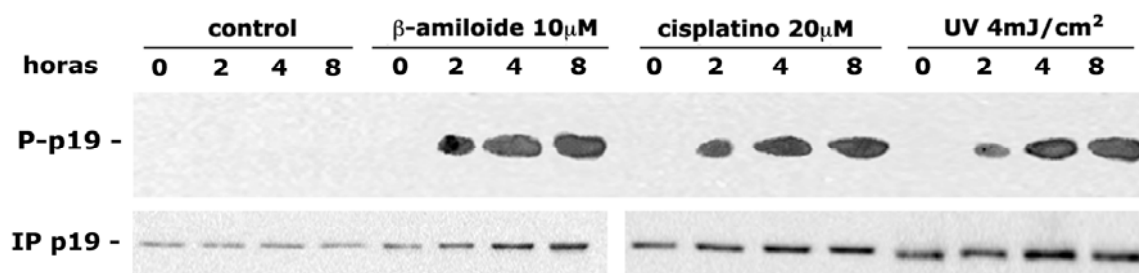


Figura 18. p19 es fosforilada en respuesta a daño genotóxico. Células WI-38 fueron preincubadas con 0,5 mCi de ^{32}P -ortofosfato de sodio durante 3 horas y tratadas posteriormente con péptido β -amiloide (10 μM), *cisplatin*o (20 μM) ó radiación UV (4 mJ/cm^2). Cantidades iguales de proteínas (100 μg) de las muestras recolectadas a diferentes tiempos luego del daño fueron inmunoprecipitadas usando un anticuerpo anti-p19 humano. Los complejos inmunes fueron sujetos a SDS-PAGE 12% y la fosforilación fue analizada a través de la utilidad Storm Phosphoimager Scanner. Niveles de p19 inmunoprecipitado fueron analizados por Western blot. La figura es representativa de 2 ensayos independientes. (P-p19, p19 fosforilada; IP p19, p19 inmunoprecipitada)

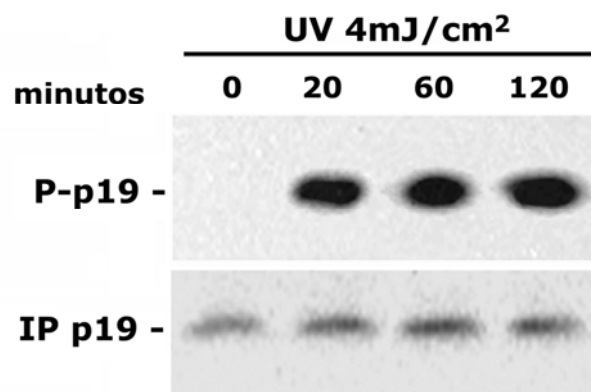


Figura 19. p19 es fosforilada a tiempos cortos en respuesta a daño por UV. Células WI-38 fueron preincubadas con 0,5 mCi de ^{32}P -ortofosfato de sodio durante 3 horas y tratadas posteriormente con radiación UV (4 mJ/cm^2). Cantidades iguales de proteínas (100 μg) de las muestras recolectadas a diferentes tiempos luego del daño fueron inmunoprecipitadas usando un anticuerpo anti-p19 humano. Los complejos inmunes fueron sujetos a SDS-PAGE 12% y la fosforilación fue analizada a través de la utilidad Storm Phosphoimager Scanner. Niveles de p19 inmunoprecipitado fueron analizados por Western blot. La figura es representativa de 2 ensayos independientes.

2.2 Predicción de sitios de fosforilación en p19

En el punto anterior demostramos que p19 es fosforilada en respuesta a daños que lesionan el ADN. El siguiente objetivo que planteamos consistió en identificar los sitios de p19 que resultan fosforilados luego del daño.

Como primer abordaje, empleamos una herramienta informática predictiva de sitios potenciales de fosforilación. La herramienta Netphos 2.0 server permite predecir sitios potenciales de fosforilación en residuos de serina, treonina y tirosina.

Luego del análisis de la secuencia de la proteína p19 humana encontramos 4 sitios con alta probabilidad de ser fosforilados: serina 13 , serina 76, treonina 89 y treonina 141, con los scores respectivos 0.956, 0.975, 0.899 y 0.962 (**Figura 20**). En el análisis, además, son señalados otros 2 sitios, serina 66 y serina 73, cuyos scores, 0.626 y 0.573, se encuentran más cercanos al punto de corte definido en 0.5, lo que sugiere una menor probabilidad de fosforilación en los mismos.

Continuamos el análisis *in silico* con el objeto de determinar si estos sitios potenciales de fosforilación se encontraban conservados en diferentes especies. Analizamos la secuencia proteica de 4 especies : *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, y *Macaca mulatta*. Este análisis fue llevado a cabo utilizando el programa T-Coffee, que permite el alineamiento de múltiples secuencias (**Figura 21**). Encontramos que los seis sitios con potencial para ser fosforilados (los de alta probabilidad serinas 13 y 76, y treoninas 89 y 141, y los de probabilidad media serinas 66 y 73) se encuentran conservados en las cuatro especies de mamíferos analizadas.

La conservación de estos sitios entre diferentes especies apoya las predicciones obtenidas a través de la herramienta Netphos 2.0 server.

Predicciones en serina

Name	Pos	Context	Score	Pred
		v		
p19	13	GDRLSGAAA	0.956	*S*
p19	53	MMFGSTAIA	0.002	.
p19	66	KQGASPNVQ	0.626	*S*
p19	73	VQDTSGTSP	0.573	*S*
p19	76	TSGTSPVHD	0.975	*S*
p19	124	TAVVSFLAA	0.011	.
p19	130	LAAESDLHR	0.031	.
		^		

Predicciones en treonina

Name	Pos	Context	Score	Pred
		v		
p19	44	RFGKTALQV	0.115	.
p19	54	MFGSTAIAL	0.024	.
p19	72	NVQDTSGTS	0.280	.
p19	75	DTSGTSPVH	0.181	.
p19	84	DAARTGFLD	0.356	.
p19	89	GFLDTLKVL	0.899	*T*
p19	106	VPDGTGALP	0.107	.
p19	120	QEGHTAVVS	0.056	.
p19	141	ARGLTPLEL	0.962	*T*
		^		

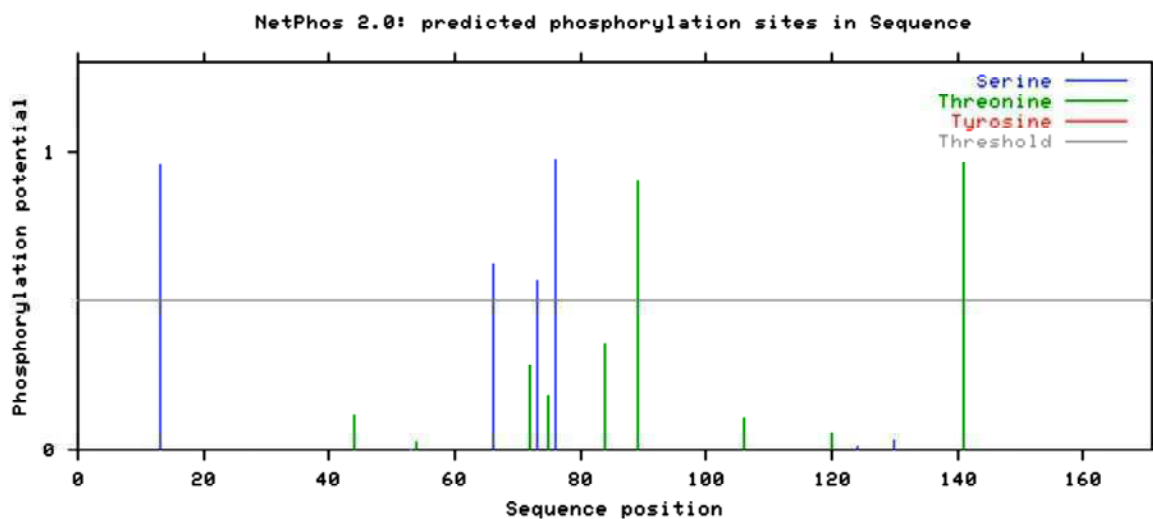


Figura 20. Análisis de sitios potenciales de fosforilación en la proteína p19. La secuencia proteica de p19 fue analizada a través de la herramienta Netphos 2.0 para determinar los sitios potenciales de fosforilación. El punto de corte para este análisis fue establecido en 0,5.

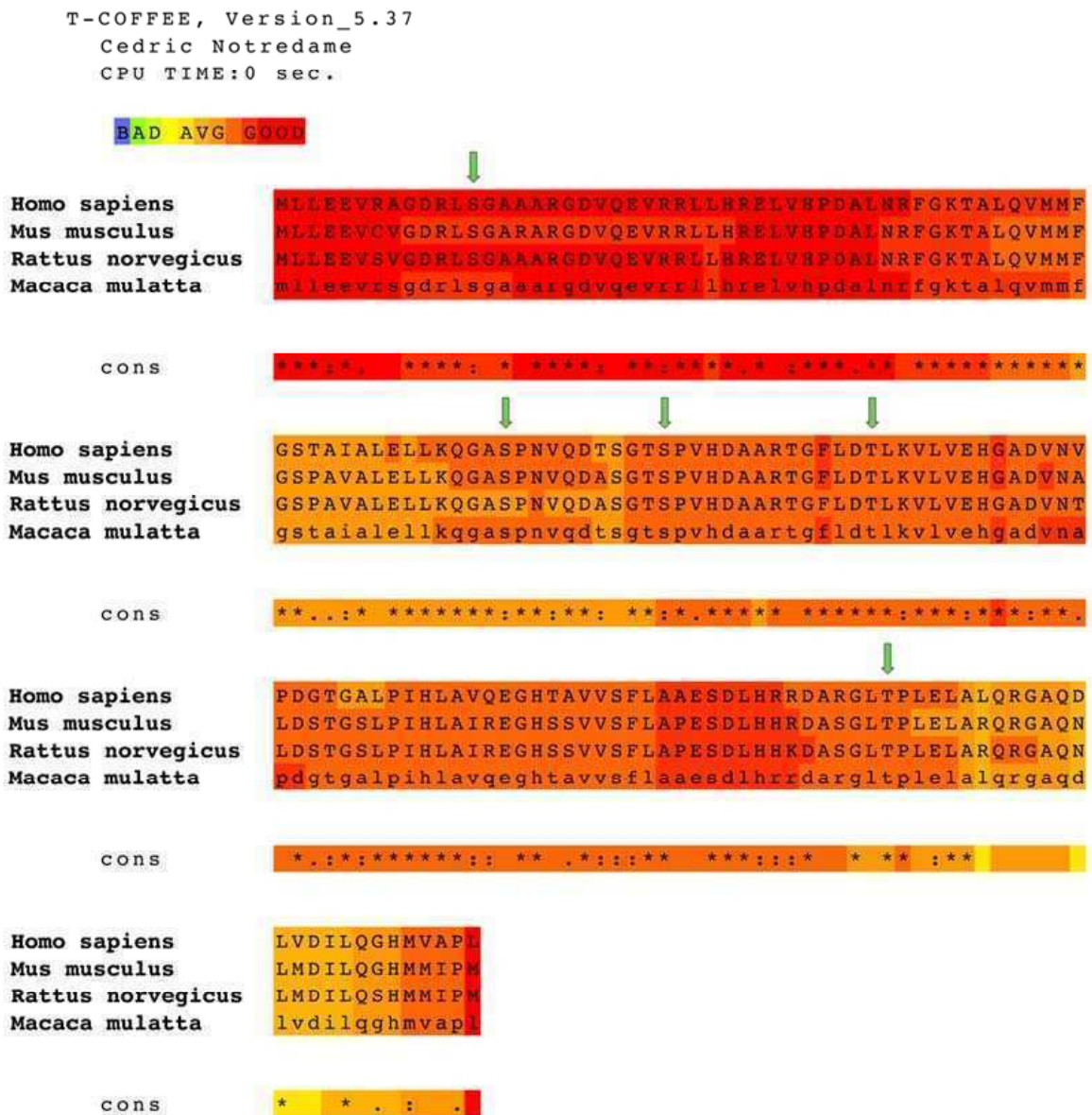


Figura 21. Conservación de los sitios potenciales de fosforilación de p19 en diferentes especies. Alineamiento de secuencias de p19 para las especies *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* y *Macaca mulatta*. Este análisis fue realizado utilizando el programa T-Coffee.

2.3 Los sitios serina 76 y treonina 141 son críticos para la fosforilación de p19

El análisis *in silico* predice 6 sitios potenciales de fosforilación en p19. A continuación analizamos si alguno de estos sitios está involucrado en la fosforilación de esta proteína luego de la exposición a agentes genotóxicos. La estrategia utilizada consistió en construir mutantes puntuales para cada uno de estos sitios y determinar, *in vivo*, si estas mutaciones modifican la capacidad de p19 de ser fosforilada.

Construimos estas mutantes reemplazando los residuos de serina o treonina por alanina para 5 de estos sitios. No se construyó una mutante para la serina en la posición 73 en vista de su baja probabilidad de constituir un verdadero sitio de fosforilación. Las secuencias mutantes de p19, denominadas mutantes de fosforilación, fueron clonadas en el vector pcDNA4 V5/HIS C que expresa la proteína fusionada al epítipo V5. La versión p19 salvaje (p19wt) también fue clonada en este vector. El epítipo V5 resulta útil al momento de discriminar entre la proteína endógena y la mutante en los ensayos que se describen más adelante.

La capacidad de estas mutantes de ser fosforiladas se analizó por medio de ensayos de marcación metabólica. Cada una de las mutantes de fosforilación, así como la construcción de p19 salvaje, fueron transfectadas en células BHK-21 y, 24 horas después, incubadas con ^{32}P -ortofosfato siguiendo el protocolo descrito para la figura 18, a excepción del anticuerpo utilizado en el paso de inmunoprecipitación que fue reemplazado por un anticuerpo contra el epítipo V5.

En primer lugar observamos, como era esperable, que p19wt sobreexpresada no fue fosforilada en esta línea celular. Por otro lado, la aplicación de UV como dañador efectivamente indujo la fosforilación de p19wt (**Figura 22A**). Este comportamiento concuerda con el observado para p19 endógena, concluyendo de estos datos que el sistema resulta adecuado para este estudio.

Continuando con el análisis, encontramos que las mutantes en serina 13, 66 y treonina 89 (p19S13A, p19S66A, p19T89A) son fosforiladas en forma similar entre ellas y al mismo nivel que p19wt. Sin embargo, el nivel de fosforilación de la mutante en treonina 141 (p19T141A) resultó notablemente disminuido. Aún más, la versión de p19 mutada en serina 76 (p19S76A) perdió por completo la capacidad de ser fosforilada (**Figura 22B**). La reducción o la eliminación completa de la fosforilación estarían indicando que, al mutar la serina 76 o la treonina 141, se han eliminado sitios efectivos de fosforilación.

Concluimos que serina 76 y treonina 141 serían sitios fosforilados en la proteína p19 en respuesta a la acción de genotóxicos.

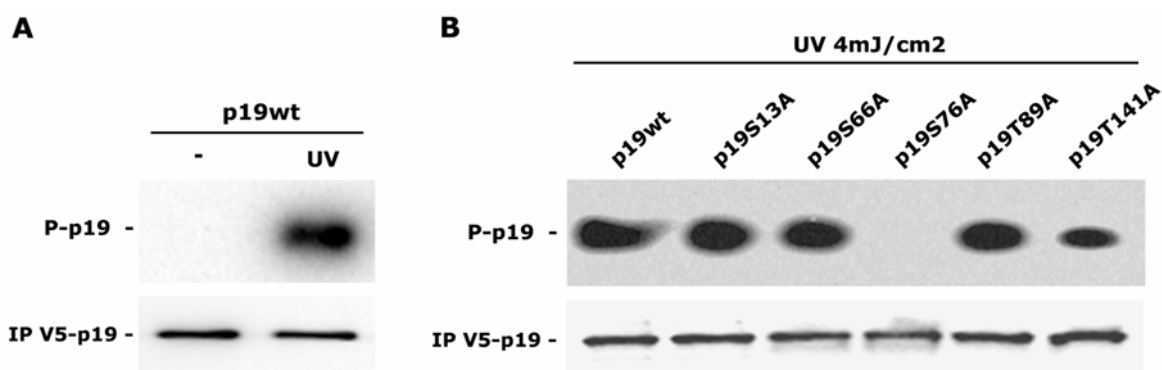


Figura 22. Las mutantes p19S76A y p19T141A modifican su capacidad de fosforilación. Células BHK-21 fueron transfectadas con p19wt (**A y B**) ó con las mutantes p19S13A, p19S66A, p19S76A y p19T141A (**B**) las cuales son expresadas fusionadas al epítipo V5. Veinticuatro horas luego de la transfección fueron preincubadas con 0,5 mCi de ^{32}P -ortofosfato de sodio durante 3 horas y tratadas posteriormente con radiación UV (4 mJ/cm²). Cantidades iguales de proteínas (200 μg) de las muestras recolectadas 2 horas luego del daño fueron inmunoprecipitadas usando un anticuerpo anti-V5. Los complejos inmunes fueron sujetos a SDS-PAGE 12% y la fosforilación fue analizada a través de la utilidad Storm Phosphoimager Scanner. Niveles de p19 inmunoprecipitado fueron analizados por Western blot con un anticuerpo anti-V5. La figura es representativa de 2 ensayos independientes. (IP V5-p19, p19 fusionada a V5 inmunoprecipitada).

2.4 Predicción de quinasas responsables de la fosforilación de p19

La descripción de los aminoácidos serina 76 y treonina 141 como sitios responsables de la fosforilación en p19 luego del daño al ADN, abre el interrogante sobre las posibles quinasas actuantes sobre ellos. Como primera aproximación en el estudio de las quinasas involucradas, utilizamos la herramienta bioinformática NetphosK 1.0 server. Esta es una herramienta computacional que permite predecir quinasas específicas para determinados sitios de fosforilación.

Del resultado de este análisis observamos que una quinasa de la familia CDK, CDK5, podría potencialmente fosforilar en la serina 76 y que la proteína quinasa A (PKA) sería responsable de la fosforilación en treonina 141 (**Tabla 3**).

Tabla 3. Predicción de proteínas quinasas

Pos	AA	Quinasa	Score
13	S	PKC	0.6055
66	S	cdc2	0.5273
75	T	cdc2	0.5186
76	S	CDK5	0.555
89	T	PKC	0.692
130	S	CKII	0.5553
141	T	PKA	0.5315

Pos: posición en la secuencia de p19INK4d
 AA: aminoácido
 Herramienta utilizada en el análisis:
 NetphosK

2.5 PKA y miembros de la familia CDK están involucrados en la fosforilación de p19

El primer paso en el estudio de las quinasas responsables de fosforilar a p19 consistió en la utilización de inhibidores específicos, para las quinasas obtenidas en el análisis predictivo, en ensayos de fosforilación *in vivo*. En este sentido, se realizaron transfecciones transitorias de p19wt en células BHK-21. Empleamos dos inhibidores de quinasas, H-89, específico de PKA y Roscovitina, un potente inhibidor de CDK1, CDK2, CDK5 y CDK7. Los inhibidores fueron agregados al medio de cultivo una hora antes de la inducción del daño.

Encontramos que la inhibición de la enzima PKA redujo en gran medida la fosforilación de p19wt. Por su parte, el agregado de Roscovitina condujo a la completa inhibición de la fosforilación de esta proteína. Similares resultados fueron obtenidos con cualquiera de los tres agentes genotóxicos ensayados (**Figura 23**).

Estos resultados muestran que efectivamente PKA y alguna de las CDKs, participan del proceso de fosforilación de p19. Aún más, la inhibición de PKA, resulta en el mismo patrón de fosforilación que el observado para la mutante p19T141A (ver **Figura 22**), y la inhibición de las CDKs, deriva en la inhibición total de la fosforilación imitando lo ocurrido para la mutante p19S76A.

Concluimos que tanto PKA como alguna CDK inhibida por Roscovitina, participan en la fosforilación de p19 en respuesta a daño, siendo la treonina 141 y la serina 76 los sitios potenciales de ser fosforilados por estas quinasas, respectivamente.

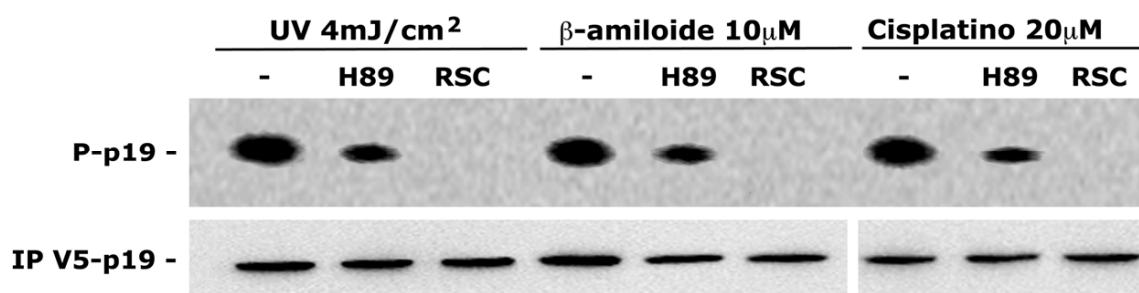


Figura 23. PKA y algún miembro de la familia CDK participan en la fosforilación de p19. Células BHK-21 fueron transfectadas con p19wt fusionada al epítotope V5. Veinticuatro horas luego de la transfección las células fueron preincubadas con 0,5 mCi de ³²P-ortofosfato de sodio durante 3 horas y tratadas posteriormente con péptido β-amiloide (10 µM), *cis*platino (20 µM) ó radiación UV (4 mJ/cm²). Cantidades iguales de proteínas (200 µg) de las muestras recolectadas 2 horas luego del daño fueron inmunoprecipitadas usando un anticuerpo anti-V5. Los complejos inmunes fueron sujetos a SDS-PAGE 12% y la fosforilación fue analizada a través de la utilidad Storm Phosphoimager Scanner. Niveles de p19 inmunoprecipitado fueron analizados por Western blot con un anticuerpo anti-V5. La figura es representativa de 3 ensayos independientes.

2.6 p19 es fosforilada en forma secuencial

Hasta aquí demostramos que la eliminación del sitio serina 76 ó la inhibición de las CDKs por Roscovitina, potenciales quinasas actuando sobre este aminoácido, eliminan por completo la posibilidad de fosforilación de p19. Además, hemos visto que, tanto el reemplazo de la treonina 141 como la inhibición de PKA, potencial quinasa de este sitio, disminuyen la fosforilación de p19 aunque sin inhibirla completamente. Estos resultados nos llevan a plantear como hipótesis una fosforilación secuencial de p19 en respuesta a daño. En primer lugar p19 sería fosforilada en serina 76 por alguna de las CDKs mencionadas, siendo este primer evento necesario para permitir una segunda fosforilación esta vez en el sitio treonina 141 y en un proceso catalizado por PKA.

Para estudiar más en profundidad esta hipótesis, empleamos ensayos de marcación metabólica sobre las mutantes de fosforilación de p19 utilizando ahora los inhibidores de PKA y CDKs. Sumamos una nueva mutante al estudio, denominada

p19ANKless, en la cual fue eliminado el último dominio ankirina conteniendo la treonina 141. El último dominio ankirina en p19 es el que presenta menor homología de secuencia con el resto de las INK4 (**Figura 37**) por lo que pensamos que en él podría residir en parte el comportamiento diferencial de p19 en la reparación.

En la **Figura 24** podemos observar que, como fue descrito anteriormente, la señal de fosforilación para p19wt disminuye pronunciadamente cuando se trata a las células con el inhibidor de PKA. Sin embargo, cuando las células transfectadas con las mutantes de treonina 141 (p19T141A y p19ANKless) son incubadas con H-89, ningún cambio es observado en el estatus de fosforilación para los dos genotóxicos evaluados. Esta última observación nos lleva a concluir que no hay en p19 otro sitio diferente a treonina 141 que involucre la fosforilación por PKA. Por otro lado, cuando se utiliza el inhibidor Roscovitina, la fosforilación es completamente inhibida en las mutantes en treonina 141.

Cómo era de esperar, para las mutantes en serina 76 (p19S76A, p19S76T141A) no se detectó fosforilación por UV ni tampoco por péptido β -amiloide, aún en ausencia de inhibidores.

Estos resultados apoyan la idea de la fosforilación secuencial de p19 mediada por agentes genotóxicos, en la cual sería necesaria, en primer lugar la fosforilación por alguna CDK en serina 76, para que luego pudiera ocurrir la segunda fosforilación en treonina 141 por la enzima PKA.

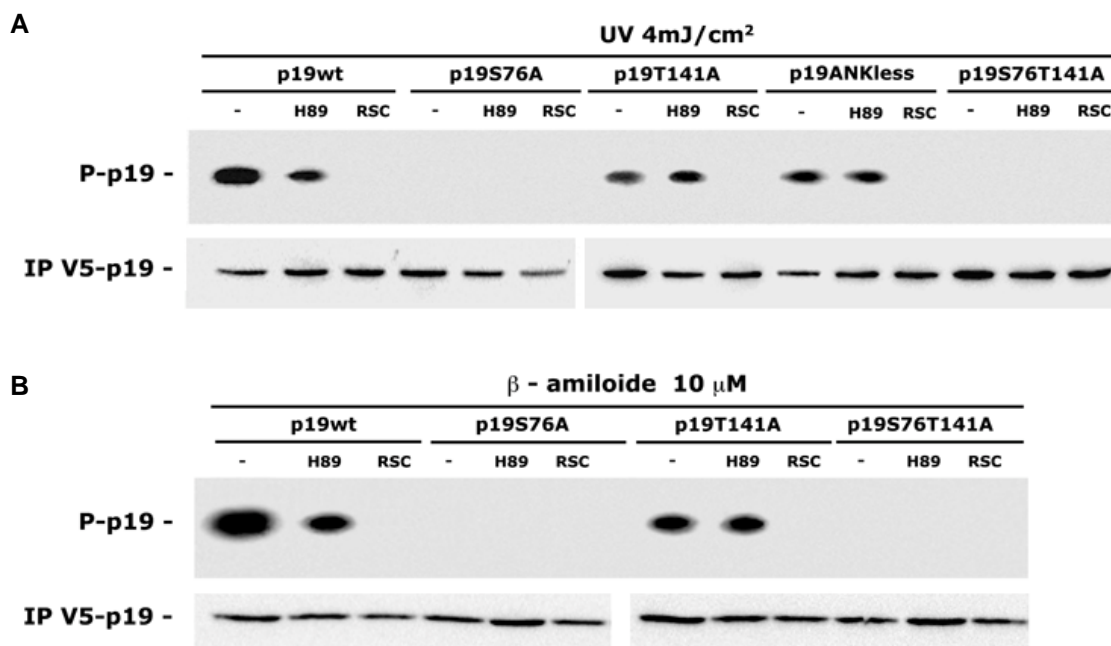


Figura 24. Fosforilación secuencial de p19. Células BHK-21 fueron transfectadas con p19wt ó con las mutantes p19S13A, p19S66A, p19S76A y p19T141A (**A y B**) las cuales son expresadas fusionadas al epítoto V5. Veinticuatro horas luego de la transfección fueron preincubadas con 0,5 mCi de ³²P-ortofosfato de sodio durante 3 horas. Una hora antes del daño las células fueron tratadas con los inhibidores H-89 (1 μM) inhibidor de PKA y roscovitina (10 μM), inhibidor de CDKs. Posteriormente, fueron dañadas con (**A**) radiación UV (4 mJ/cm²) ó (**B**) péptido β-amiloide (10 μM). Cantidades iguales de proteínas (200 μg) de las muestras recolectadas 2 horas luego del daño fueron inmunoprecipitadas usando un anticuerpo anti-V5. Los complejos inmunes fueron sujetos a SDS-PAGE 12% y la fosforilación fue analizada a través de la utilidad Storm Phosphoimager Scanner. Niveles de p19 inmunoprecipitado fueron analizados por Western blot con un anticuerpo anti-V5. La figura es representativa de 3 ensayos independientes.

2.7 Simulación de fosforilación secuencial en p19

En vista de los resultados descriptos, nuestro siguiente objetivo consistió en evaluar mediante simulación *in silico* las consecuencias estructurales que ocurrirían en p19 en respuesta a las modificaciones post-traduccionales postuladas, para finalmente contrastar este resultado con la hipótesis de secuencialidad planteada a partir del análisis *in vivo*. Para ello, empleamos una técnica computacional, llamada Dinámica Molecular (MD, por Molecular Dynamics), simulando la fosforilación secuencial en p19. Este estudio se realizó en colaboración con el Dr. Marcelo Martí integrante del Laboratorio de Biología Estructural del Depto. de Química Biológica, FCEyN-UBA.

La MD es una técnica de simulación molecular en la cual la evolución temporal de un grupo de átomos que interactúan puede ser seguida mediante la integración de sus ecuaciones de movimiento (Beard and Schlick, 2001). Comenzamos el análisis de p19 estudiando, en principio, su estructura sin tener en cuenta las modificaciones post-traduccionales a través del programa VMD (Visual Molecular Dynamics). La proteína p19 está formada por 5 repeticiones de motivos ankirina de aproximadamente 30 a 35 residuos aminoacídicos. Cada repetición consiste en un motivo estructural tipo horquillas β (*β -hairpin*) seguido de 2 α -hélices antiparalelas cada una de, aproximadamente, 10 residuos aminoacídicos (**Figura 25**). La primera repetición carece del *β -hairpin* inicial. Se observó que p19 es una molécula de alta rigidez de acuerdo a lo indicado por el valor de RMSF menor a 2 (RMSF, *Root Mean Square Fluctuation*). Este parámetro es utilizado como indicador de flexibilidad. Regiones parcialmente flexibles se encuentran en los 4 giros tipo *β -hairpin* y entre las hélices I y II en la quinta repetición anquirina. El análisis detallado de los residuos postulados de ser fosforilados muestra que el grupo hidroxilo de la serina 76 se encuentra formando enlaces tipo puentes de hidrógeno entre el grupo carbonilo de la valina 69 o el nitrógeno en posición δ de la histidina 79. El hidroxilo en la treonina 141 forma puentes de hidrógeno con el carboxilo del ácido glutámico (Glu) en posición 144 y éste a su vez interactúa fuertemente con la arginina (Arg) 135.

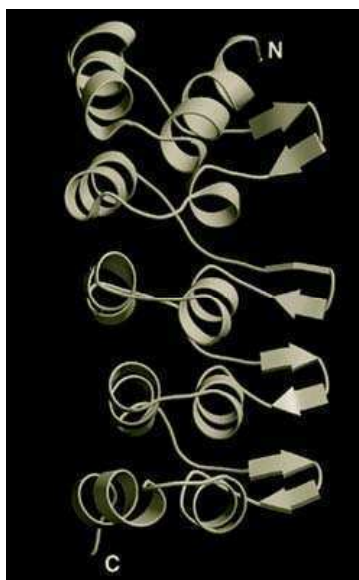


Figura 25. Esquema de la estructura de p19 formada por 5 repeticiones de motivos ankirina.

La comparación directa entre las estructuras promedio de p19 y p19 fosforilada en serina 76 (P-p19), realizada a través del programa AMBER, muestra que dichas

estructuras son muy similares con un valor total de RMSD de 2,03 (RMSD, *Root Mean Square Deviation*). Este parámetro es utilizado como medida numérica de las diferencias entre 2 estructuras, es la medida de la distancia promedio entre los esqueletos carbonados superpuestos de las proteínas analizadas (**Figura 26A**). Sin embargo, la simulación de la fosforilación en serina 76, postulada como la primera en ocurrir, produce un aumento marcado en la movilidad del motivo β -*hairpin* de la tercera repetición ankirina, donde se encuentra serina 76, y también en el de la cuarta repetición. En la estructura de p19 ambos *hairpins* se encuentran cercanos entre sí pero la presencia del grupo fosfato separa estas estructuras. Un incremento en la movilidad, también se observa en el motivo β -*hairpin* del quinto dominio ankirina donde se posiciona la treonina 141. Diferencias menores se observan también en el giro entre las hélices I y II de este último dominio.

El grupo fosfato en serina 76 se observa solvatado y formando un enlace altamente estable con el grupo amino de la asparagina 68. Las interacciones en treonina 141 no se modifican respecto de las observadas para p19 sin fosforilar.

Por otro lado, cuando se simula la fosforilación de los dos residuos serina 76 y treonina 141 (PP-p19), la movilidad es muy similar a la observada para P-p19. La comparación directa entre las estructuras de P-p19 y PP-p19 muestra, como era esperado, que las principales diferencias se encuentran en el quinto dominio ankirina donde está localizada la treonina 141 (**Figura 26B**). La presencia del grupo fosfato rompe la interacción entre Arg 135 y Glu 144. El aminoácido Glu 144 es alejado y se establece, entonces, una fuerte interacción entre Arg 135 y el grupo fosfato.

Los resultados de este análisis sugieren que la fosforilación en serina 76 podría conducir a cambios conformacionales del tercer al quinto motivo ankirina en esta molécula. Llamativamente, en este último motivo, los cambios son observados en la región que contiene a la treonina 141. Postulamos que estos cambios conformacionales generados por la fosforilación en serina 76 podrían permitir la interacción entre p19 y una segunda quinasa, probablemente PKA, que actúe sobre el sitio treonina 141. Finalmente, los cambios observados por esta segunda fosforilación podrían favorecer interacciones con otras proteínas ligadas a la función de p19 en la reparación del ADN.

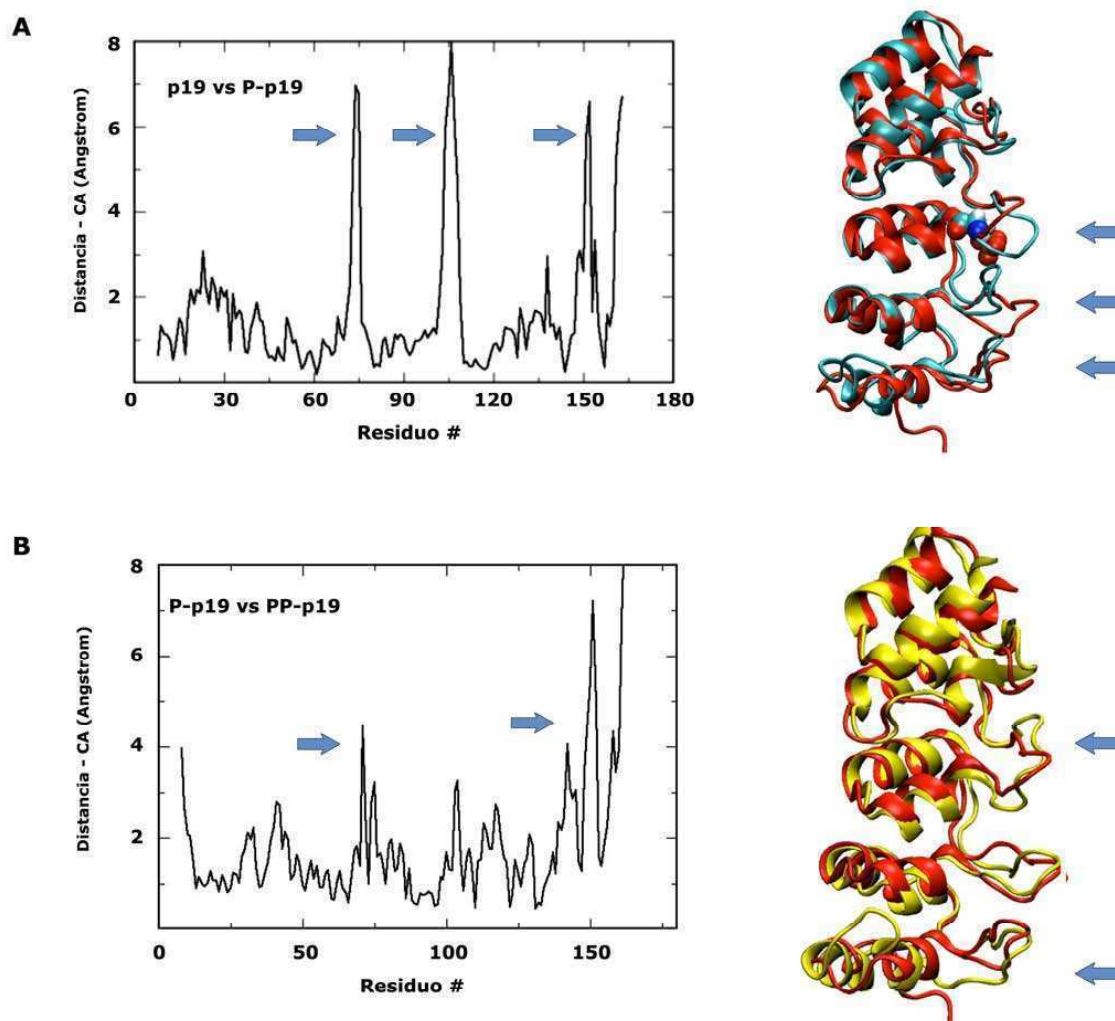


Figura 26. Simulación de la fosforilación de p19 en serina 76 y treonina 141. (A) Distancia-CA entre las estructuras promedio de p19 y p19 fosforilada en serina 76 (P-p19). Comparación entre las estructuras de p19 (celeste) y P-p19 (rojo) en serina76. **(B)** Distancia-CA entre las estructuras promedio de P-p19 y p19 fosforilada en serina 76 y treonina 141 (PP-p19). Comparación entre las estructuras de P-p19 (rojo) y PP-p19 (amarillo).

2.8 CDK2 está involucrada en la fosforilación de p19

En las figuras 23 y 24 demostramos, utilizando un inhibidor específico para ciertos miembros de la familia CDK, que alguna de estas enzimas está relacionada con la fosforilación de p19. Por otro lado, la predicción de quinasas con potencial para fosforilar p19 mostró a CDK5 como candidata a fosforilar esta proteína en serina 76 (Tabla 3). CDK5 es una serina treonina quinasa con alto grado de homología con

CDK1 y CDK2 (Meyerson et al., 1992). La expresión de CDK5 es principalmente abundante en el sistema nervioso central adulto, se observa en un nivel intermedio en testículo y a bajo niveles o de forma indetectable en otros tejidos (Tsai et al., 1994). En cuanto a la actividad de CDK5, solo a sido descripta en cerebro y no se ha encontrado actividad en líneas celulares de otros tejidos a pesar de contar con alta expresión de CDK5 (Tsai et al., 1994). Este hecho se debe a que la activación de CDK5 depende de la presencia de su subunidad regulatoria p35 la cual tiene un patrón de expresión específico de neuronas. En base a estos datos, y teniendo en cuenta que en los modelos celulares en dónde fue evaluada la fosforilación, hasta aquí al menos, no fue reportada la expresión de p35, lo cual excluiría la participación de CDK5, decidimos evaluar si CDK1 y/o CDK2 podrían estar implicadas en la fosforilación de p19. Tanto CDK1 como CDK2 comparten la misma secuencia consenso de fosforilación que CDK5, la cual está constituida por una serina ó treonina seguida por una prolina y un aminoácido básico en la posición +3, es decir, (S/T) PX (K/H/R) (Songyang et al., 1994; Songyang et al., 1996). La secuencia de p19 en la región de serina 76, potencial aminoácido fosforilado por CDKs, tiene un consenso perfecto para estas quinasas constituido por la secuencia S P V H (**Figura 20 A**).

En primer lugar, buscamos disminuir la expresión de CDK1 o de CDK2 a través de la utilización de un oligonucleótido antisentido específico para sus secuencias (ASCDK1 y ASCDK2). La efectividad del oligonucleótido diseñado para cada una fue evaluada en la línea celular WI-38. Las células fueron transfectadas con estos oligonucleótidos, 24 horas antes de la recolección de las muestras. Observamos que los niveles de ARNm de CDK1 y CDK2 resultaron disminuidos en los tratamientos con ASCDK1 y ASCDK2 respectivamente, considerándolos entonces como adecuados para continuar con los siguientes ensayos (**Figura 27**).

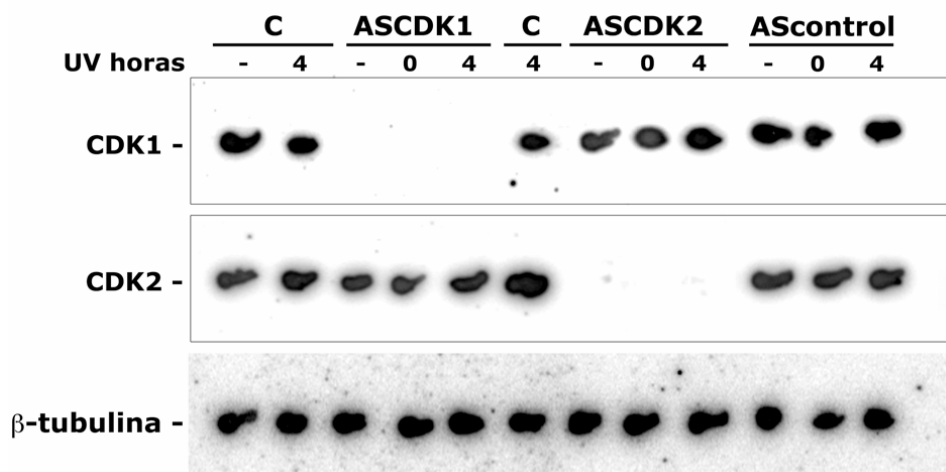


Figura 27. Disminución de los niveles de CDK1 y CDK2 utilizando oligonucleótidos antisentido específicos. Células WI-28 fueron transfectadas o no con un oligonucleótido antisentido específico para CDK1 ó CDK2 (ASCDK1 y ASCDK2) ó con un oligonucleótido inespecífico (AScontrol). 24 horas luego de la transfección las células fueron irradiadas o no con UV (4 mJ/cm^2) y las muestras recolectadas en los tiempo indicados. ARN total ($20\mu\text{g}$) fueron analizados por Northern blot con las sondas marcadas con ^{32}P indicadas en el margen izquierdo. La figura es representativa de 2 ensayos independientes.

Estudiamos, luego, si la disminución en los niveles de CDK1 o CDK2 mostraba algún efecto sobre la fosforilación de p19 endógena. Nuevamente, el oligonucleótido contra las CDKs fue transfectado 24 horas antes de comenzar el ensayo de fosforilación *in vivo*. Analizando los resultados podemos ver que, el empleo de ASCDK2, disminuye sensiblemente los niveles de fosforilación de p19 (**Figura 28**). La inhibición incompleta del proceso de fosforilación, en este caso, podría explicarse señalando que los niveles proteicos de CDK2 no fueron disminuidos en su totalidad por esta técnica. Por otro lado, el oligonucleótido ASCDK1 no tuvo efecto sobre la fosforilación. Sin embargo, no podemos descartar su participación en la fosforilación de p19 a partir de este resultado. CDK1 tiene actividad principalmente en las fases G2/M. Estos ensayos fueron realizados en células asincrónicas, por lo cual la población de células en estas fases es baja. Por lo tanto, si CDK2 y CDK1 estuvieran realmente fosforilando a p19, la disminución en los niveles de CDK1 podría no afectar la fosforilación observada del inhibidor. La actividad de CDK2, en mayor proporción en las células asincrónicas, podría ocultar el cambio en la fosforilación de p19 dado por el empleo del oligonucleótido ASCDK1. Este punto será desarrollado más profundamente en la discusión de este trabajo.

Concluimos de esa figura que CDK2 efectivamente participa de la fosforilación de p19 en respuesta a luz UV. Por otro lado, la participación de CDK1 mediante esta estrategia debería ser evaluada nuevamente en poblaciones de células sincronizadas.

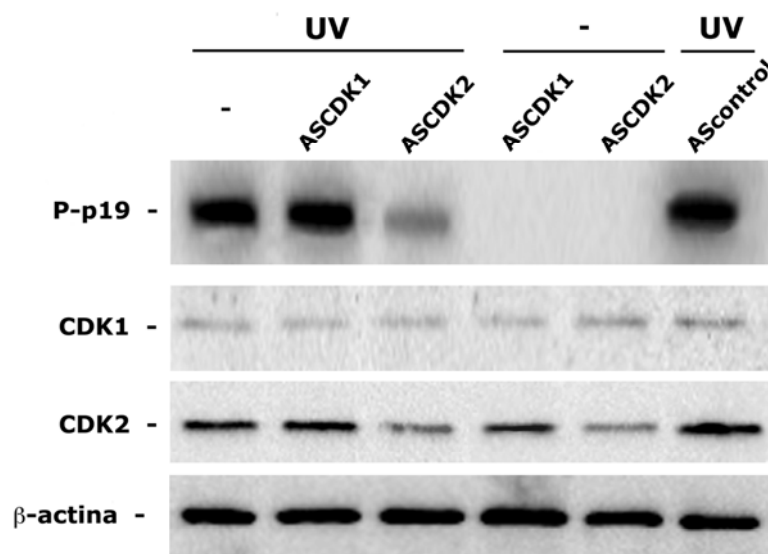


Figura 28. CDK2 participa en la fosforilación de p19. Células WI-28 fueron transfectadas o no con un oligonucleótido antisentido específico para CDK1 ó CDK2 (ASCDK1 y ASCDK2) ó con oligonucleótido inespecífico (AScontrol). Veinticuatro horas luego de la transfección fueron preincubadas con 0,5 mCi de ^{32}P -ortofosfato de sodio durante 3 horas. Posteriormente, fueron dañadas o no con radiación UV (4 mJ/cm^2). Cantidades iguales de proteínas ($150 \mu\text{g}$) de las muestras recolectadas 2 horas luego del daño fueron inmunoprecipitadas usando un anticuerpo anti-p19 humano. Los complejos inmunes fueron sujetos a SDS-PAGE 12% y la fosforilación fue analizada a través de la utilidad Storm Phosphoimager Scanner. Los extractos utilizados en la inmunoprecipitación fueron analizados por Western Blot para las proteínas indicadas. La figura es representativa de 3 ensayos independientes.

2.9 CDK2 y CDK5 tienen la capacidad de fosforilar en forma directa a p19

Continuamos evaluando la posibilidad de que p19 estuviera siendo fosforilada en forma directa por las CDKs antes mencionadas, CDK2 y CDK5. Comenzamos con ensayos de fosforilación *in vitro* empleando péptidos de p19 conteniendo el sitio serina 76 potencialmente fosforilable por estas quinasas (p-S76: RGTSPVHDAART). Para ello se utilizaron células HEK-293T que fueron irradiadas con luz UV. Treinta minutos después las células fueron recolectadas y se prepararon extractos. CDK2 fue inmunoprecipitada con un anticuerpo específico a partir de dichos extractos.

Del mismo modo, CDK5 fue inmunoprecipitada a partir de células SH-SY5Y de neuroblastoma en las cuales fue reportada su actividad (Sharma M. et. Al., 2002). Los inmunoprecipitados fueron incubados junto con los péptidos en un buffer de reacción adecuado conteniendo γ ^{32}P -ATP, a 30 °C y por 30 minutos. El volumen total, luego de la reacción, fue sembrado en papel de fosfoceulosa y la marca radioactiva medida a través de un contador de centelleo. Como control de la actividad de las enzimas inmunoprecipitadas se utilizó un péptido de histona H1 conteniendo una secuencia consenso para CDKs (p-H1: PKTPKKAKKL) dado que las diferentes variantes de histona 1 (H1) poseen varios sitios consenso para estas quinasas (Talaszi et al., 1996). Los altos niveles de marca radioactiva en las muestras del péptido H1 muestran que las quinasas inmunoprecipitadas se encontraban activas bajo las condiciones del ensayo (**Figura 29 A y B**). Los resultados obtenidos para el péptido S76, cuando es incubado tanto con CDK2 como con CDK5, muestran altos niveles de incorporación de ^{32}P en el mismo. Este hecho señala que el péptido de p19 efectivamente puede ser fosforilado por ambas quinasas estudiadas.

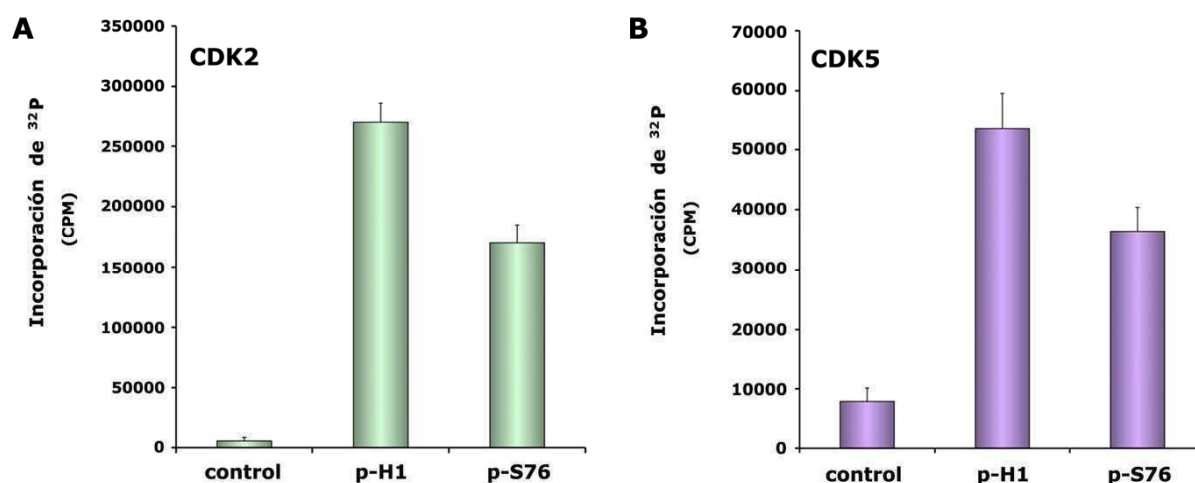


Figura 29. CDK2 y CDK5 fosforilan en forma directa un péptido de p19. Ensayos de fosforilación *in vitro* de un péptido de p19 conteniendo el sitio definido de fosforilación serina 76 (p-S76). Células HEK-293T fueron irradiadas con luz UV y 30 minutos luego del daño se prepararon extractos a partir de los cuales fue inmunoprecipitada CDK2. Del mismo modo, CDK5 fue inmunoprecipitada a partir de células SH-SY5Y. Otro péptido conteniendo un sitio de fosforilación para CDK correspondiente a la proteína H1 fue utilizado como control de actividad de las quinasas. Los inmunoprecipitados de CDK2 (**A**) y CDK5 (**B**) fueron incubados junto con los péptidos en un buffer de reacción adecuado conteniendo ^{32}P -ATP, a 30 °C y por 30 minutos. El volumen total de reacción fue absorbido en papel de fosfoceulosa y la marca radiactiva medida a través de un contador de centelleo. La figura muestra la media \pm DE de los valores obtenidos en dos ensayos independientes por triplicado.

Los resultados observados con la aplicación de esta primera estrategia apoyan la posibilidad de la acción directa de CDK2 o CDK5 sobre el sitio serina 76 en p19.

Ahondando en este punto, realizamos ensayos de fosforilación *in vitro* con las quinasas CDK2 y CDK5 pero ahora sobre la proteína p19 entera. Para esto, en primer lugar expresamos y purificamos la proteína recombinante GST-p19 (**Figura 30 A y B**). Una vez purificada esta proteína realizamos ensayos de fosforilación *in vitro* obteniendo CDK2 ó CDK5 tal como fue descrito para la Figura 29. Observamos que cuando GST-p19 es incubada con CDK2, se obtiene una banda de fosforilación correspondiente al peso molecular de GST-p19. Un resultado similar se obtiene cuando la quinasa utilizada en la incubación es CDK5 (**Figura 31 A y B**). Histona H1 fue empleada como control de la actividad de las enzimas. Concluimos que, tanto CDK2 como CDK5, son capaces de fosforilar *in vitro* a p19 y que el motivo que incluye el sitio serina 76 sería el sustrato de estas quinasas.

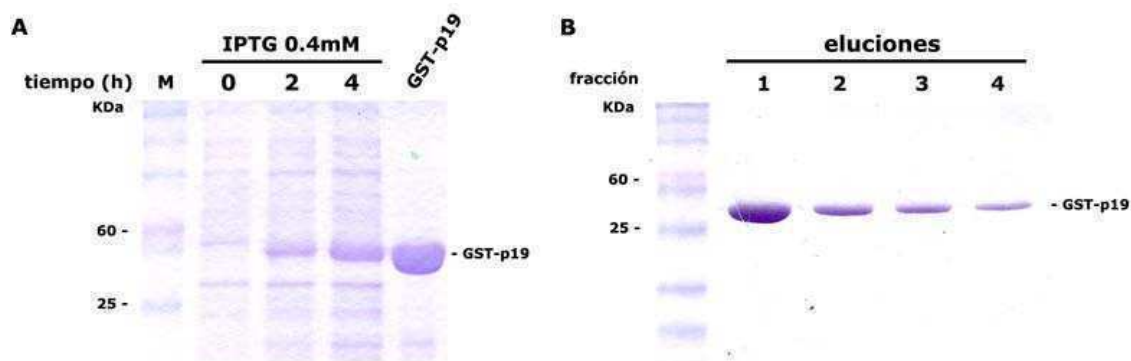


Figura 30. Inducción y purificación de GST-p19. (A) Cultivos de bacterias *BL21(DE3)pLys GST-p19* fueron incubados con IPTG (0,4 mM) a 37 °C por 4 horas para inducir la expresión de GST-p19. Muestras a diferentes tiempos de incubación (15 μ l) fueron tomadas y analizadas por SDS-PAGE 12% y tinción por Coomassie Blue para verificar la inducción. La purificación de GST-p19 fue realizada a través de una resina de intercambio con glutatión según el protocolo descrito por el fabricante (SIGMA). (B) Muestras de los eluidos de esta purificación (10 μ l) fueron analizadas por SDS-PAGE 12% y teñidas con Coomassie Blue.

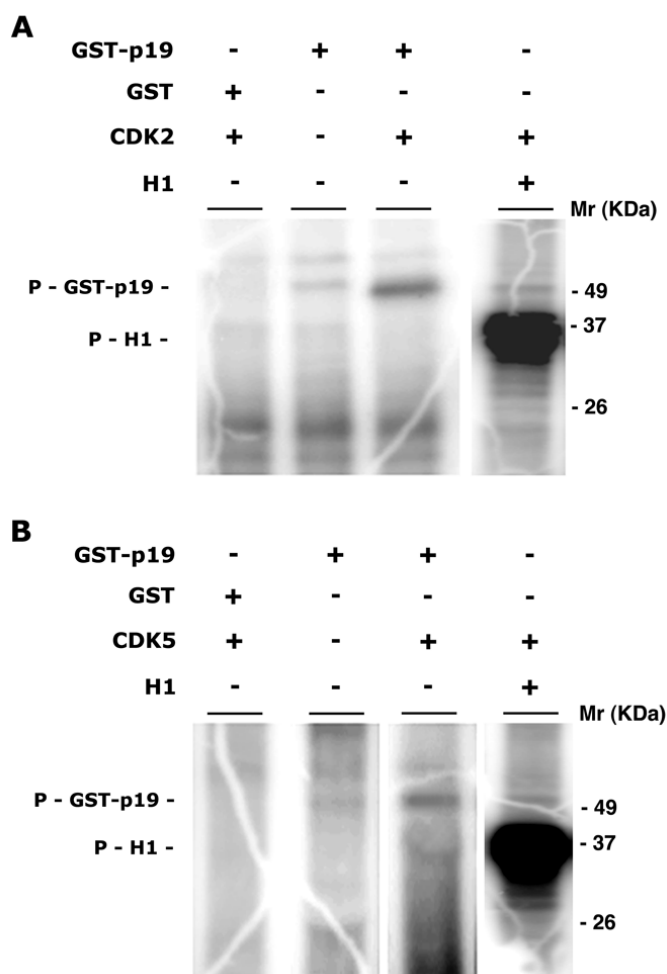


Figura 31. Fosforilación de GST-p19 por CDK2 y CDK5. Ensayos de fosforilación *in vitro* de GST-p19 por CDK2 y CDK5. Células HEK-293T fueron irradiadas con luz UV y 30 minutos luego del daño se prepararon extractos a partir de los cuales fue inmunoprecipitada CDK2. Del mismo modo, CDK5 fue inmunoprecipitada a partir de células SH-SY5Y. Muestras sin el agregado de anticuerpo para inmunoprecipitar también fueron preparadas. Histona H1 fue utilizada como control de actividad de las quinasas. Los inmunoprecipitados de CDK2 (**A**) y CDK5 (**B**) fueron incubados junto con GST, GST-p19 ó Histona H1. Como control, GST-p19 también fue incubada con las muestras precipitadas sin anticuerpo. La reacción fue realizada en un buffer de reacción adecuado conteniendo 32 ATP, a 30°C y por 30 minutos. Finalizada la reacción las muestras fueron separadas por SDS-PAGE 12% y la fosforilación en el gel fue analizada a través de la utilidad Storm Phosphoimager Scanner. La figura es representativa de tres ensayos independientes.

2.10 PKA puede fosforilar en forma directa a p19

En experimentos anteriores hemos demostrado que PKA participa de la fosforilación de p19 en respuesta a daño genotóxico y postulamos que la fosforilación

dependiente de esta quinasa ocurriría en la treonina 141. Buscamos entonces evaluar si PKA tiene capacidad de fosforilar directamente a p19. Empleamos, en primer lugar, el ensayo de fosforilación *in vitro* descrito para la figura 29, que implica la utilización de péptidos con residuos potenciales de ser fosforilados. En este caso, la secuencia de p19 a estudiar consistió en un péptido conteniendo la treonina 141 (p-T141: RDARGLTPLELA). Se utilizó la subunidad catalítica de PKA (PKAc) purificada de corazón bovino y liofilizada (cedida gentilmente por la Dra. Silvia Rossi, del Laboratorio de Biología Molecular, FCEN-UBA). Como control de la actividad de la enzima se utilizó un péptido sustrato de PKA denominado kémtido. El kémtido es un heptapéptido derivado del sitio de fosforilación de la piruvato quinasa en hígado y cuya secuencia es la siguiente: Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly. PKAc y los péptidos fueron incubados en un buffer de reacción adecuado conteniendo γ ^{32}P -ATP, a 30 °C y por 30 minutos. El volumen total, luego de la reacción fue sembrado en papel de fosfocelulosa y la marca radioactiva contenida en los papeles medida a través de un contador de centelleo.

El resultado de este ensayo muestra altos niveles de marca radioactiva en la muestra del kémtido corroborando la actividad de PKAc bajo las condiciones del ensayo (**Figura 32**). Encontramos que el péptido T141 también tiene altos niveles de incorporación de ^{32}P al ser incubado con PKAc. Esta observación demuestra que esta secuencia de p19 efectivamente puede ser fosforilada por la enzima. Este resultado apoya la posibilidad de una actividad directa de PKA sobre el sitio treonina 141 en p19.

Profundizando en el estudio de la fosforilación directa de p19 por PKA, realizamos ensayos de fosforilación *in vitro* con la subunidad catalítica de la quinasa PKA pero ahora sobre la proteína p19 entera (**Figura 33**). Al igual que para el caso del estudio de las CDKs, utilizamos en este punto la proteína recombinante GST-p19. Encontramos que cuando GST-p19 es incubada con PKAc en condiciones adecuadas esta proteína resulta fosforilada. No se observa fosforilación para GST sola incubada con PKAc. Más aún, la fosforilación en GST-p19 resulta específica de PKAc puesto que la incubación con H89 la inhibe por completo. Como control de actividad de la enzima utilizamos la proteína CREB

Estos resultados, en conjunto, señalan que PKA es capaz de fosforilar *in vitro* a p19 y que el motivo que incluye el sitio treonina 141 sería el sustrato de esta quinasa.

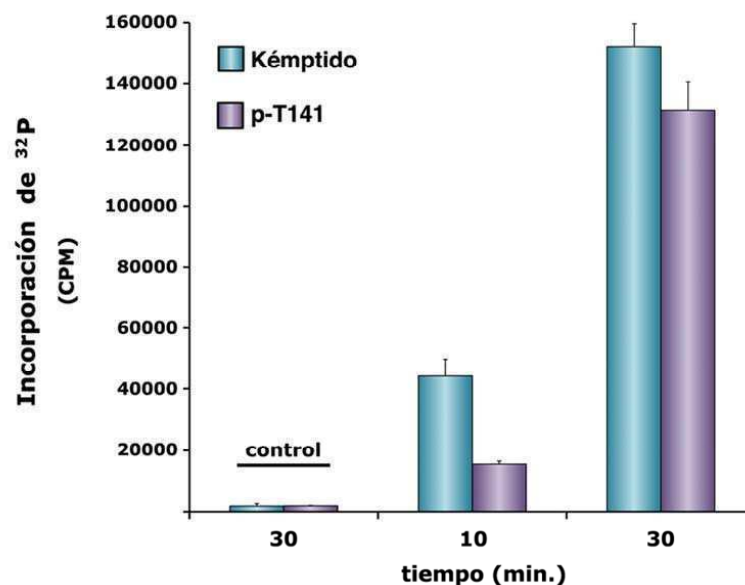


Figura 32. PKA fosforila en forma directa un péptido de p19. Ensayos de fosforilación *in vitro* de un péptido de p19 conteniendo el sitio definido de fosforilación treonina 141 (p-T141). Otro péptido conteniendo un sitio de fosforilación para PKA (Kémptido) fue utilizado como control de actividad de la quinasa. PKAc purificada de corazón bovino fue incubada con los péptidos en un buffer de reacción adecuado conteniendo ³²ATP, a 30 °C y por 30 minutos. El volumen total de reacción fue absorbido en papel de fosfocelulosa y la marca radiactiva medida a través de un contador de centelleo. La figura muestra la media ± D.E. de los valores obtenidos en dos ensayos independientes por triplicado.

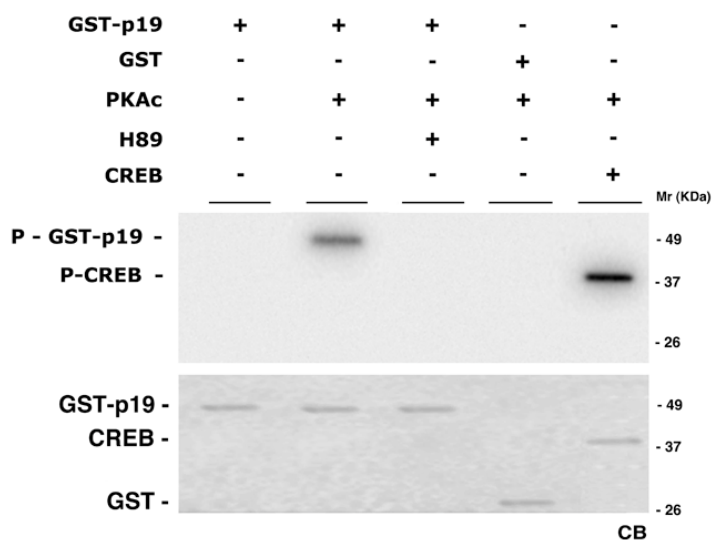


Figura 33. Fosforilación de GST-p19 por PKA. Ensayos de fosforilación *in vitro* de GST-p19 por PKAc. PKAc fue incubada o no junto con GST, GST-p19 ó CREB. H-89 fue agregado a la reacción en las muestras indicadas para inhibir la actividad de la enzima PKA. La reacción fue realizada en un buffer adecuado conteniendo ³²ATP, a 30 °C y por 30 minutos. Finalizada la reacción las muestras fueron separadas por SDS-PAGE 12% y la fosforilación en el gel analizada a través de la utilidad Storm Phosphoimager Scanner. La figura es representativa de dos ensayos independientes.

2.11 PKA interacciona con p19 *in vivo*

Habiendo demostrado que p19 puede ser fosforilada directamente por PKAc *in vitro*, nos propusimos determinar si estas proteínas podrían interaccionar también *in vivo*.

Para llevar a cabo este punto, realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación en los cuales se transfectaron, en células BHK-21, vectores de expresión para p19wt y la subunidad catalítica de PKA (PKAc). Las células, dañadas con luz UV 24 horas luego de la transfección, fueron cosechadas y los extractos preparados a los 45 minutos de aplicado el daño. Los extractos fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-V5 y los complejos inmunes analizados por Western blot con un anticuerpo anti-PKA (**Figura 34**). Podemos observar que PKAc co-inmunoprecipita con V5-p19, demostrando que PKA efectivamente interacciona con p19 *in vivo* post-daño.

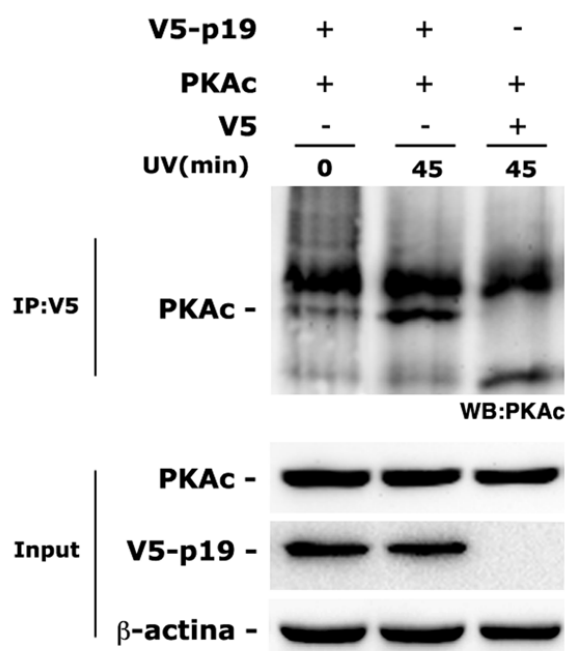


Figura 34. p19 interacciona con PKA. Células BHK-21 fueron co-transfectadas con p19wt fusionada al epítipo V5 ó con el vector sin la secuencia de p19 y con PKAc. Veinticuatro horas después de la transfección las células fueron dañadas con radiación UV (4 mJ/cm²) y las muestras cosechadas a diferentes tiempos. Cantidades iguales de proteínas (200 µg) de las muestras recolectadas fueron inmunoprecipitadas usando un anticuerpo anti-V5. Los complejos inmunes fueron sujetos a SDS-PAGE 12%. La co-inmunoprecipitación de PKAc y p19wt fue analizada por Western Blot utilizando un anticuerpo anti-PKAc. Los extractos utilizados en la inmunoprecipitación fueron analizados para las proteínas indicadas por Western Blot con un anticuerpo anti-V5, anti-PKAc y anti-β-actina. La figura es representativa de 3 ensayos independientes.

2.12 La fosforilación de p19 luego de daño genotóxico es iniciada en el citoplasma

En nuestro laboratorio se ha demostrado que, en condiciones basales, p19 se localiza en el citoplasma y que, frente a un daño en el ADN, es translocada al núcleo (Ceruti et al., 2005). Sin embargo, el análisis de la secuencia proteica de p19 con la herramienta bioinformática PSORTII, no identifica la presencia de una señal de localización nuclear (NLS). En este sentido, la fosforilación observada en p19 luego de daño se presenta como una posible forma de control temporal y espacial de su relocalización.

Comenzamos por analizar el compartimento celular en el cual p19 es fosforilada en respuesta a la acción de genotóxicos. Se utilizaron células WI-38 las cuales fueron marcadas metabólicamente con ^{32}P -ortofosfato, dañadas con luz UV y cosechadas a diferentes tiempos luego del daño (0, 20, 40, 60 y 120 minutos). El fraccionamiento subcelular se realizó utilizando una solución hipotónica para obtener la fracción citoplasmática (C) y una solución de alta concentración salina y agitación mecánica en el caso de la fracción nuclear (N). La proteína p19 fue inmunoprecipitada a partir de las diferentes fracciones y los inmunoprecipitados con marca radioactiva analizados como fue descrito anteriormente.

Encontramos que a partir de los 20 minutos y hasta al menos los 40 minutos luego del daño, p19 fosforilada se encuentra solamente en la fracción citoplasmática (**Figura 35A**). Sin embargo, alcanzando los 60 minutos, p19 fosforilada es encontrada tanto en la fracción citoplasmática como en la nuclear. El mismo patrón se observa a los 120 minutos de inducido el daño.

Cuando analizamos la localización de la proteína por Western blot, encontramos que p19 se encuentra en citoplasma a los 20 minutos de generado el daño y que, luego de 60 minutos, la proteína aparece en la fracción nuclear (**Figura 35B**). Este resultado concuerda con la cinética de translocación observada en el ensayo de la fosforilación.

Estas observaciones nos permiten concluir que la fosforilación de p19 ocurre, ó al menos es iniciada, en el citoplasma y que, luego de ser fosforilada en este compartimiento, se produce la translocación nuclear. Este hecho contribuye con la hipótesis previa que relaciona la translocación nuclear de p19 en respuesta al daño, con esta modificación post-traducciona.

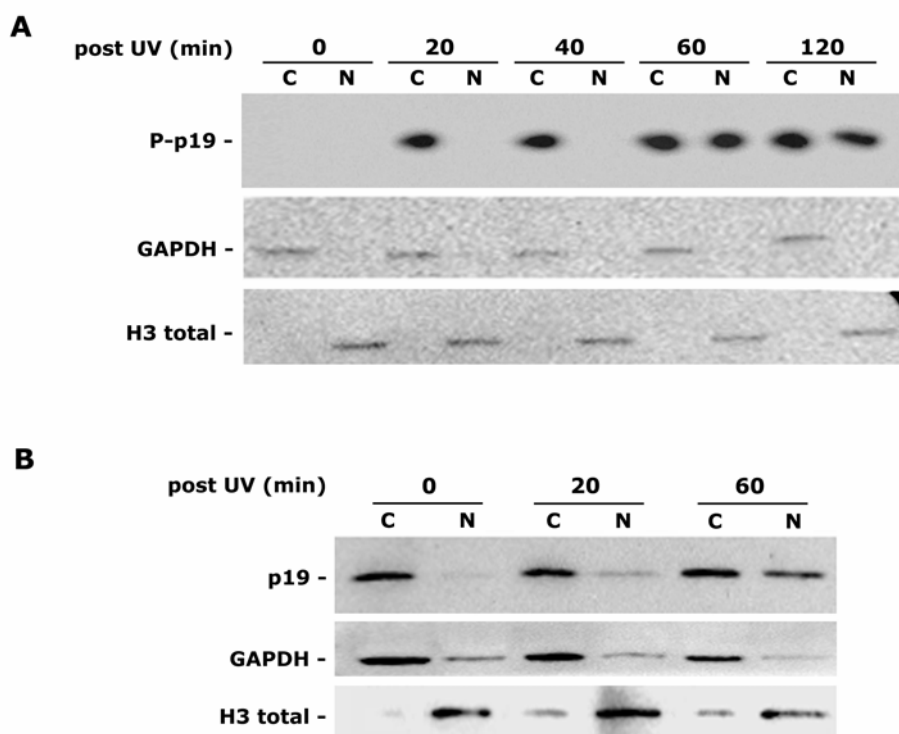


Figura 35. La fosforilación de p19 es al menos iniciada en citoplasma. (A) Células WI-38 fueron preincubadas con 0,5 mCi de ^{32}P -ortofosfato de sodio durante 3 horas y tratadas posteriormente con radiación UV (4 mJ/cm^2). Las muestras fueron cosechadas en los tiempos indicados y cada una fue sujeta a fraccionamiento subcelular. Cantidades iguales de proteínas ($150 \mu\text{g}$) de las muestras recolectadas a diferentes tiempos luego del daño fueron inmunoprecipitadas usando un anticuerpo anti-p19 humano. Los complejos inmunes fueron sujetos a SDS-PAGE 12% y la fosforilación fue analizada a través de la utilidad Storm Phosphoimager Scanner. **(B)** Células WI-38 fueron irradiadas con UV (4 mJ/cm^2) y cosechadas en los tiempos indicados. Cada una fue sujeta a fraccionamiento subcelular. Las muestras fueron analizadas por Western blot utilizando un anticuerpo anti-p19 humano. La eficiencia del fraccionamiento subcelular fue evaluada en los extractos con un anticuerpo anti-GAPDH como marcador de citoplasma y otro anti-histona H3 total como marcador de núcleo. La figura es representativa de 3 ensayos independientes. (C, citoplasma; N, núcleo; P-p19, proteína p19 fosforilada).

2.13 La serina en la posición 76 es necesaria para la translocación nuclear de p19

Los experimentos anteriores no nos permiten definir el papel de ambas fosforilaciones en la localización y translocación de p19. Para aclarar este punto aplicamos una estrategia similar pero utilizando las mutantes de fosforilación de p19 previamente descritas.

A partir del resultado obtenido en la figura anterior, se plantearon varias posibilidades respecto de la fosforilación de p19 en los dos sitios serina 76 y treonina 141 y su relación con la localización subcelular de p19 luego del daño genotóxico. Previamente presentamos evidencias referidas a que p19 sería fosforilada en forma secuencial, primero en serina 76 y luego en treonina 141. Una posibilidad consiste en que la fosforilación de p19, tanto en serina 76 como en treonina 141, ocurriera en el citoplasma y que alguno de estos dos eventos o ambos fueran necesarios para promover la translocación al núcleo. Otra posibilidad es que p19 fuera fosforilada en el citoplasma sólo en serina 76 y que esta modificación condujera a la translocación de la proteína para luego ser fosforilada en treonina 141 en el núcleo. Por último, podría ocurrir que ninguna de las dos fosforilaciones señaladas fueran necesarias para la relocalización nuclear post-daño.

Se realizaron ensayos de fosforilación *in vivo* transfectando células BHK-21 con vectores de expresión para p19wt o p19T141A. La mutante p19S76A no puede ser fosforilada por lo cual, lógicamente, fue excluida de este ensayo. Veinticuatro horas luego de la transfección se aplicó el daño y las muestras fueron recolectadas y fraccionadas a los 0, 20 y 60 minutos post UV. Las proteínas p19wt y p19T141A fueron inmunoprecipitadas de las fracciones C y N con el anticuerpo contra V5 y los inmunoprecipitados analizados como fue descripto anteriormente.

Comprobamos que p19wt sobreexpresada muestra el mismo patrón de comportamiento que p19 endógena: a los 20 minutos se encuentra fosforilada exclusivamente en citoplasma y luego, a partir de los 60 minutos, se observa fosforilada también en el núcleo (**Figura 36A**).

Por su parte, el análisis de la fosforilación de p19T141A muestra que esta mutante no pierde la capacidad de translocación nuclear, mostrando marca de fosforilación a los 20 minutos únicamente en citoplasma y, luego, a los 60 minutos también en el núcleo. Un resultado similar fue obtenido cuando se evaluó la fosforilación endógena de p19 en células WI-38 utilizando el inhibidor H89 para inhibir PKA, la quinasa que fosforilaría en la treonina 141 (**Figura 36A y 36B**).

El análisis de los niveles proteicos por Western blot se realizó para p19 endógena, p19wt, p19T141A y ahora sí también para p19S76A (**Figura 36A, B y C**). Como era de esperar las proteínas p19wt y p19T141A se encuentran en citoplasma al momento de aplicar el daño, observándose, a los 60 minutos, un aumento de los niveles proteicos nucleares. Llamativamente, este aumento en los niveles de proteína en el núcleo no es observado para p19S76A que no tiene capacidad de fosforilarse.

Estos resultados nos llevan a concluir dos puntos importantes. Por un lado, muestran que la mutante p19T141A se transloca al núcleo aún sin poder ser fosforilada en treonina 141 y consecuentemente descartamos este aminoácido como necesario para el pasaje de p19 al núcleo. Y por otro, vemos que p19S76A, incapaz de ser fosforilada, pierde la relocalización nuclear luego del daño, por lo cual señalamos que la fosforilación de p19, en particular la fosforilación del sitio serina 76, sí tiene un efecto sobre la translocación nuclear.

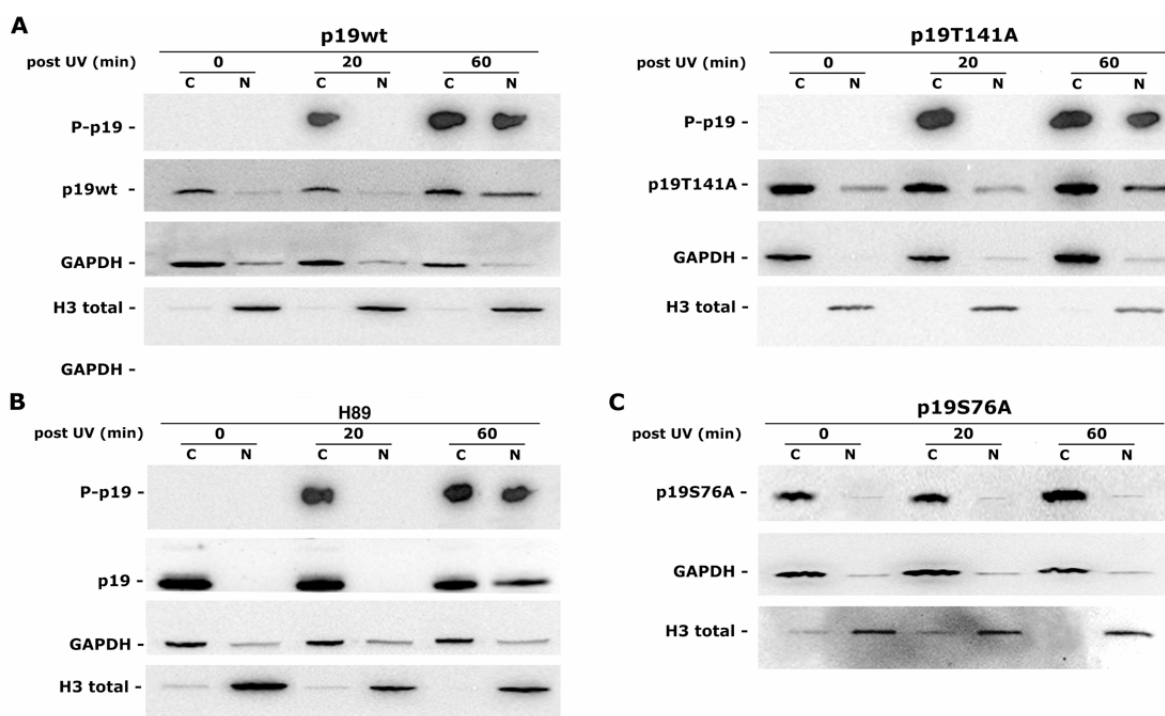


Figura 36. La fosforilación en serina 76 es necesaria para la translocación de p19 al núcleo en respuesta a daño. Células BHK-21 fueron transfectadas con p19wt ó con p19T141A (**A**); con p19wt (**B**); ó con p19S76A (**C**). En (**A**) las células fueron incubadas con 0,5 mCi de ^{32}P -ortofosfato de sodio durante 3 horas, 24 horas luego de la transfección. Posteriormente, fueron dañadas con UV (4 mJ/cm^2). Cantidades iguales de proteínas ($200 \mu\text{g}$), de las muestras recolectadas en los tiempos indicados y fraccionadas subcelularmente, fueron inmunoprecipitadas usando un anticuerpo anti-V5. Los complejos inmunes fueron sujetos a SDS-PAGE 12% y la fosforilación fue analizada a través de la utilidad Storm Phosphoimager Scanner. (**B**) Las células transfectadas fueron marcadas metabólicamente como fue descrito para (A) y 1 hora previa al daño el inhibidor de PKA, H-89 ($1 \mu\text{M}$), fue agregado al medio de incubación. Cantidades iguales de proteínas ($200 \mu\text{g}$), de las muestras recolectadas en los tiempos indicados y fraccionadas subcelularmente, fueron inmunoprecipitadas usando un anticuerpo anti-V5. Los complejos inmunes fueron analizados como fue descrito para (A). (**C**) Las células transfectadas con p19S76A fueron dañadas con UV (4 mJ/cm^2) y cosechadas en los tiempos indicados. Cada muestra fue sujeta a fraccionamiento subcelular. (**A, B, C**) Los extractos fueron analizados por Western Blot utilizando un anticuerpo anti-V5. La eficiencia del fraccionamiento subcelular fue evaluada en los extractos con un anticuerpo anti-GAPDH como marcador de citoplasma y otro anti-histona H3 total como marcador de núcleo. Las figuras son representativas de 3 ensayos independientes. (C, citoplasma; N, núcleo; P-p19, proteína p19 fosforilada)

Capítulo 3: Relevancia fisiológica del proceso de fosforilación de p19^{INK4d} en respuesta a genotóxicos

En la primera parte de este trabajo hemos demostrado que p19 presenta una función relacionada al mantenimiento de la estabilidad del genoma, caracterizada por su participación en la reparación eficiente del ADN y en el control de las aberraciones cromosómicas. En la segunda parte de esta tesis planteamos que si p19 integrara la intrincada red de proteínas que participan de la respuesta celular al daño, podría sufrir modificaciones post-traduccionales que regularan su actividad. Demostramos que p19 es fosforilada en respuesta a diferentes agentes genotóxicos como cis-platino, péptido β -amiloide y radiación UV. Describimos que la fosforilación de p19 sería secuencial actuando la quinasa CDK2 o CDK5 sobre la serina en posición 76 y luego PKA en el sitio treonina 141 y además que la fosforilación en serina 76 sería requerida para la translocación de p19 al núcleo.

En esta tercera parte investigamos la relevancia fisiológica de la fosforilación de p19 en un contexto celular de daño al ADN. Planteamos que las fosforilaciones en esta proteína serían necesarias para llevar a cabo su papel ligado a la reparación.

3.1 Análisis de la conservación de los sitios serina 76 y treonina 141 entre los miembros de la familia INK4

Las cuatro proteínas INK4 son estructuralmente similares y comparten la función de inhibir específicamente las quinasas CDK4 y CDK6. Sin embargo, encontramos que p19 es el único miembro de la familia que es inducido en respuesta a UV (**Figura 5**) y que participa en la reparación del ADN (datos no publicados). Postulamos que esta característica exclusiva de p19 podría estar relacionada con su fosforilación en respuesta a daño.

Analizamos si los sitios fosforilables descritos en p19 eran encontrados en las demás proteínas INK4. Utilizamos el programa T-Coffee para alinear las secuencias de los cuatro inhibidores (**Figura 37**). Encontramos que p19 es el único miembro de la familia INK4 que contiene los sitios serina 76 y treonina 141, estos aminoácidos no están conservados entre las INK4. La fosforilación exclusiva de p19 en estos aminoácidos podría en parte ser la responsable de la actividad singular sobre la reparación del ADN.

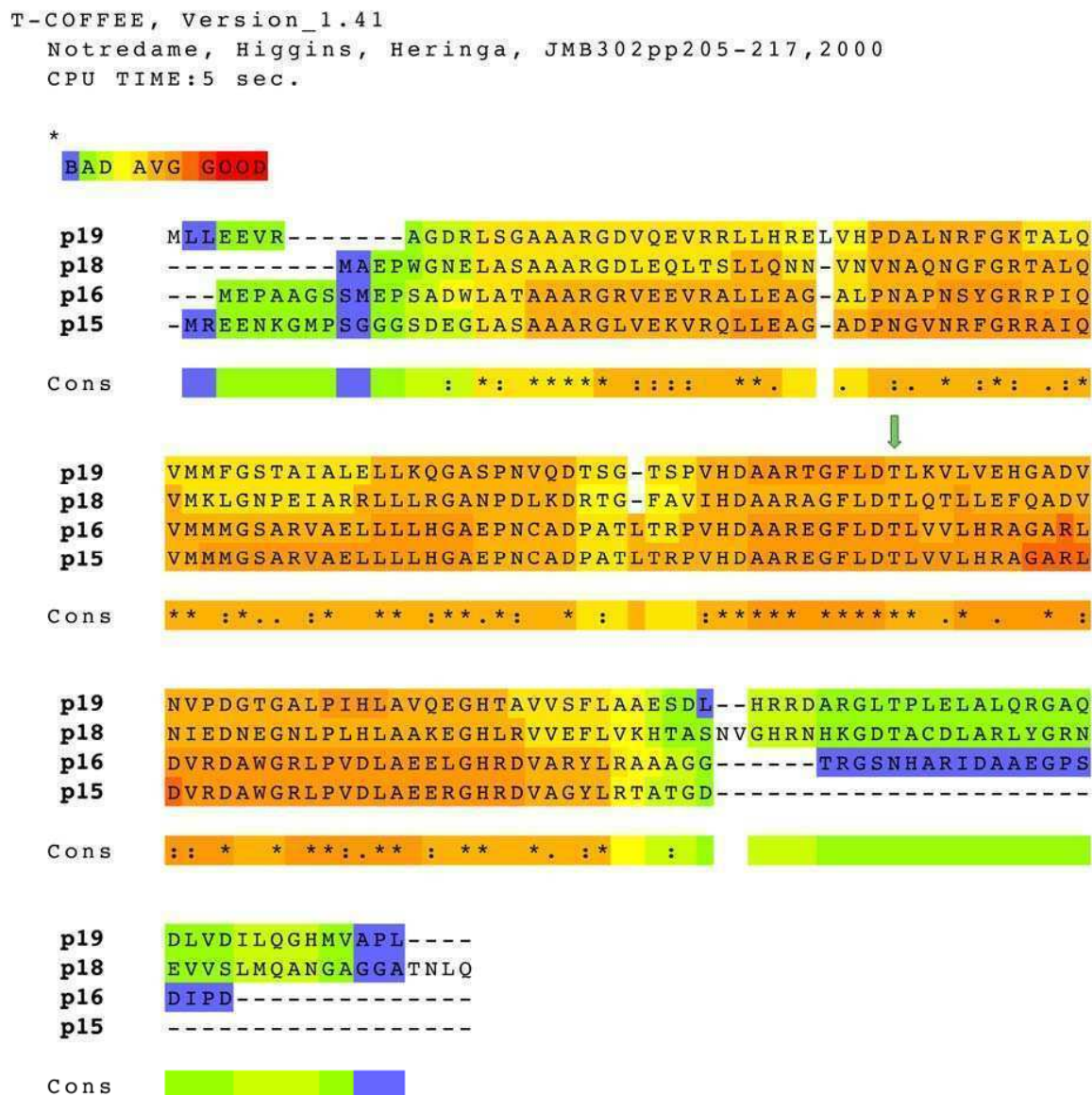


Figura 37. Los sitios serina 76 y treonina 141 no están conservados en la familia INK4. Las secuencias proteicas de los 4 miembros de la familia INK4 fueron alineadas utilizando la herramienta T-Coffe. Fue analizada la conservación de los 5 sitios postulados como potenciales de ser fosforilados. Sólo la treonina en la posición 89 se encuentra conservada.

3.2 Serina 76 y Treonina 141 son necesarias para la función de p19 en la reparación del ADN

Hemos demostrado, utilizando la técnica de UDS, que la sobreexpresión de p19wt aumenta significativamente la capacidad de las células de reparar el ADN (**Figura 10A**). En este punto evaluamos la relevancia de la fosforilación de p19 en su función ligada a la reparación del ADN. Utilizamos en este estudio ensayos de UDS para medir la capacidad de reparación de células que sobreexpresaban las mutantes de fosforilación de p19.

Fibroblastos WI-38 fueron transfectados transitoriamente con p19wt o con las mutantes de p19 (p19S13A, p19S66A, p19S76A, p19T89A, p19T141A, p19S76T141A, p19ANKless) junto con el vector pBABE que confiere resistencia a puromicina. Veinticuatro horas luego de la transfección el medio fue reemplazado por medio sin arginina con 1% de suero fetal bovino y mantenido en estas condiciones hasta el final del ensayo (inhibiendo de este modo la replicación semiconservativa). Las células fueron seleccionadas con puromicina por 60 horas. Luego de finalizada la selección, utilizamos dos tipos de dañadores: luz UV y péptido β -amiloide. Las células dañadas fueron incubadas con ^3H -timidina por 10 horas y por último, la incorporación de ^3H -timidina fue medida como indicador de la capacidad de reparación del daño.

Encontramos que las células en las cuales fueron sobreexpresadas las mutantes p19S13A, p19S66A y p19T89A los niveles de reparación alcanzados resultaron similares a los observados por la sobreexpresión de p19wt para los dos dañadores utilizados (**Figura 38 A, B, C y D**). Por el contrario, las células sobreexpresando alguna de las mutantes en serina 76 ó en treonina 141 (p19S76A, p19T141A, p19S76T141A o p19ANKless) disminuyeron significativamente la capacidad de reparación respecto a p19wt, alcanzando niveles comparables a los observados en las células control (**Figura 38 A, B, C y D**).

Estos resultados demuestran que solamente las mutaciones que afectan el estatus de fosforilación de p19, alteran su capacidad de reparación. Concluimos, finalmente, que la fosforilación en ambos residuos, serina 76 y treonina 141, es esencial en la función de p19 de reparación del ADN.

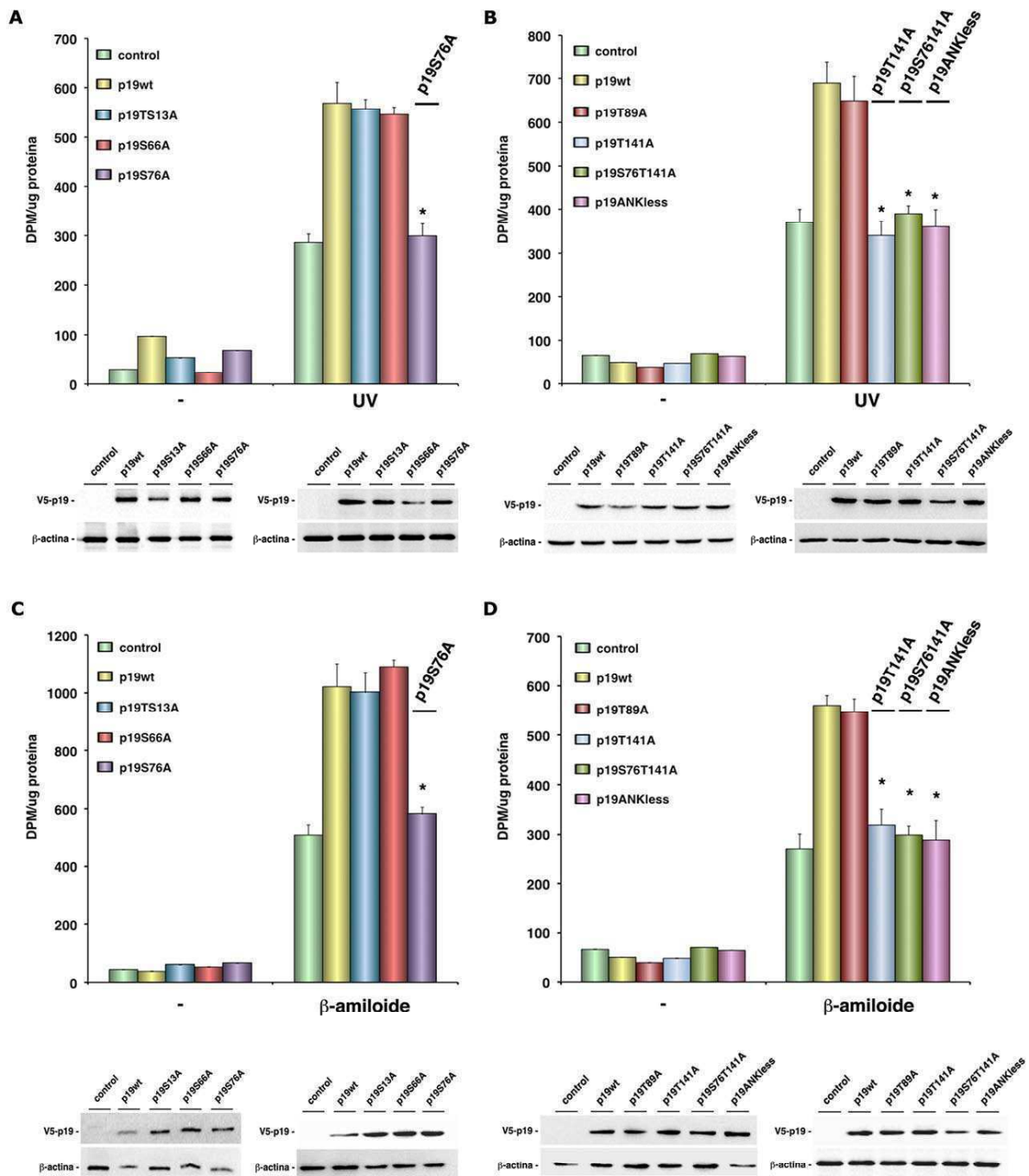


Figura 38. La serina 76 y la treonina 141 son críticas en la función de reparación. Células WI-38 fueron co-transfectadas con p19wt ó con las mutantes (p19S13A, p19S66A, p19S76A, p19T141A, p19S76T141A y p19ANKless) y el vector p-BABE con resistencia a puomicina. Luego de 24 horas la selección de las células transfectadas fue iniciada por el agregado de puomicina y además mantenidas en medio libre de arginina conteniendo 1% de suero fetal bovino durante 60 horas. Pasado este tiempo, las células resistentes fueron irradiadas con 4 mJ/cm² de UV (**A y B**), o dañadas con β-amiloide (10 μM) (**C y D**), e incubadas con 1 mCi [3H]timidina. Los lisados celulares cosechados 10 horas luego del daño fueron analizados por ensayos de síntesis de ADN no programada (UDS). La figura muestra la media ± D.E. de los valores obtenidos en 3 ensayos independientes por triplicado. El Test de Student fue utilizado para comparar las muestras de p19wt con sus mutantes. (* P<0,01). La expresión de las diferentes proteínas fue evaluada por Western blot con un anticuerpo anti-V5.

3.3 La sobreexpresión de p19 disminuye la apoptosis inducida por genotóxicos

Dos mecanismos son esenciales en respuesta al estrés genotóxico y en el mantenimiento de la integridad del genoma: la reparación del ADN y la apoptosis. Cuando el daño al ADN es muy severo y se encuentra más allá de la capacidad de reparación, se activan programas de muerte que culminan en la eliminación de la célula irreversiblemente afectada. Habiendo demostrado, que p19 participa en la reparación eficiente del ADN y que su sobreexpresión aumenta significativamente la capacidad de reparación nos preguntamos, entonces, si esta sobreexpresión conferiría a las células una mayor resistencia a la muerte por apoptosis inducida por agentes genotóxicos. En este estudio como indicador del nivel de apoptosis, medimos la actividad de la caspasa-3. La caspasa-3 es un factor clave en la ejecución de la apoptosis en mamíferos. La caspasa-9 es activada por el complejo proteico denominado apoptosoma y esta, a su vez activa las caspasas efectoras, entre ellas la caspasa-3, lo que desencadena las últimas fases de apoptosis.

La actividad de esta caspasa fue medida en células WI-38 transfectadas transitoriamente con el plásmido que expresa p19wt o con el plásmido pcADN4c sin inserto como control y con el vector pBABE que confiere resistencia a puromicina. Las células fueron seleccionadas con puromicina por 60 horas. Las células seleccionadas fueron dañadas con UV o con péptido β -amiloide y la actividad de caspasa-3 fue medida 24 horas luego de inducido el daño. Observamos, como era de esperar, que las células controles dañadas alcanzaron niveles de actividad de caspasa-3 significativamente mayores que aquellas que no recibieron daño. Por su parte, las células que sobreexpresaban p19wt mostraron niveles de actividad significativamente reducidos respecto al control con ambos tipos de daños (**Figura 39 A, B y C**). Esta disminución en la actividad de caspasa-3 y consecuentemente en el programa de apoptosis se correlaciona con la mayor eficiencia de reparación de las células sobreexpresando p19. Concluimos que la sobreexpresión de p19 confiere mayor resistencia a la activación del proceso apoptótico en células WI-38, como también fue demostrado para otros tipos celulares en un trabajo publicado por nuestro laboratorio (Ceruti et al., 2005).

3.4 La fosforilación de p19 es necesaria en la resistencia que ejerce p19 contra la apoptosis.

Hemos descrito que la sobreexpresión de p19 mejora sensiblemente la capacidad de las células de reparar el ADN y que este aumento en la reparación está correlacionado con la disminución en la muerte por apoptosis. Teniendo en cuenta que la función en la reparación que ejerce p19 requiere de su fosforilación, estudiamos el efecto de las mutantes de fosforilación sobre la apoptosis inducida por daño.

Evaluamos la actividad de caspasa-3 en células WI-38 transfectadas con los vectores que expresan las mutantes de fosforilación p19S13A, p19S66A, p19S76A, p19T89A, p19T141A, p19S76T141A y p19ANKless (**Figura 39 A, B y C**). En este análisis observamos que las mutantes en los sitios p19S13A, p19S66A y p19T89, que no modifican el nivel de fosforilación de la proteína frente a daño, disminuyeron la actividad de caspasa-3 a valores similares a los obtenidos por la sobreexpresión de p19wt. Por el contrario, las mutantes p19S76A, p19T141A, p19S76T141A y p19ANKless, que pierden parcial o totalmente la capacidad de ser fosforiladas, presentan niveles de actividad de caspasa-3 similares a los de las células control frente a los dos daños empleados, UV y péptido β -amiloide.

Estos resultados permiten concluir que las mutantes que pierden la función de reparación del ADN también pierden la capacidad de proteger a las células de la apoptosis cuando son sobreexpresadas. La fosforilación tanto del sitio serina 76 como la de treonina 141 resultan fundamentales en la resistencia que ejerce p19 contra la apoptosis.

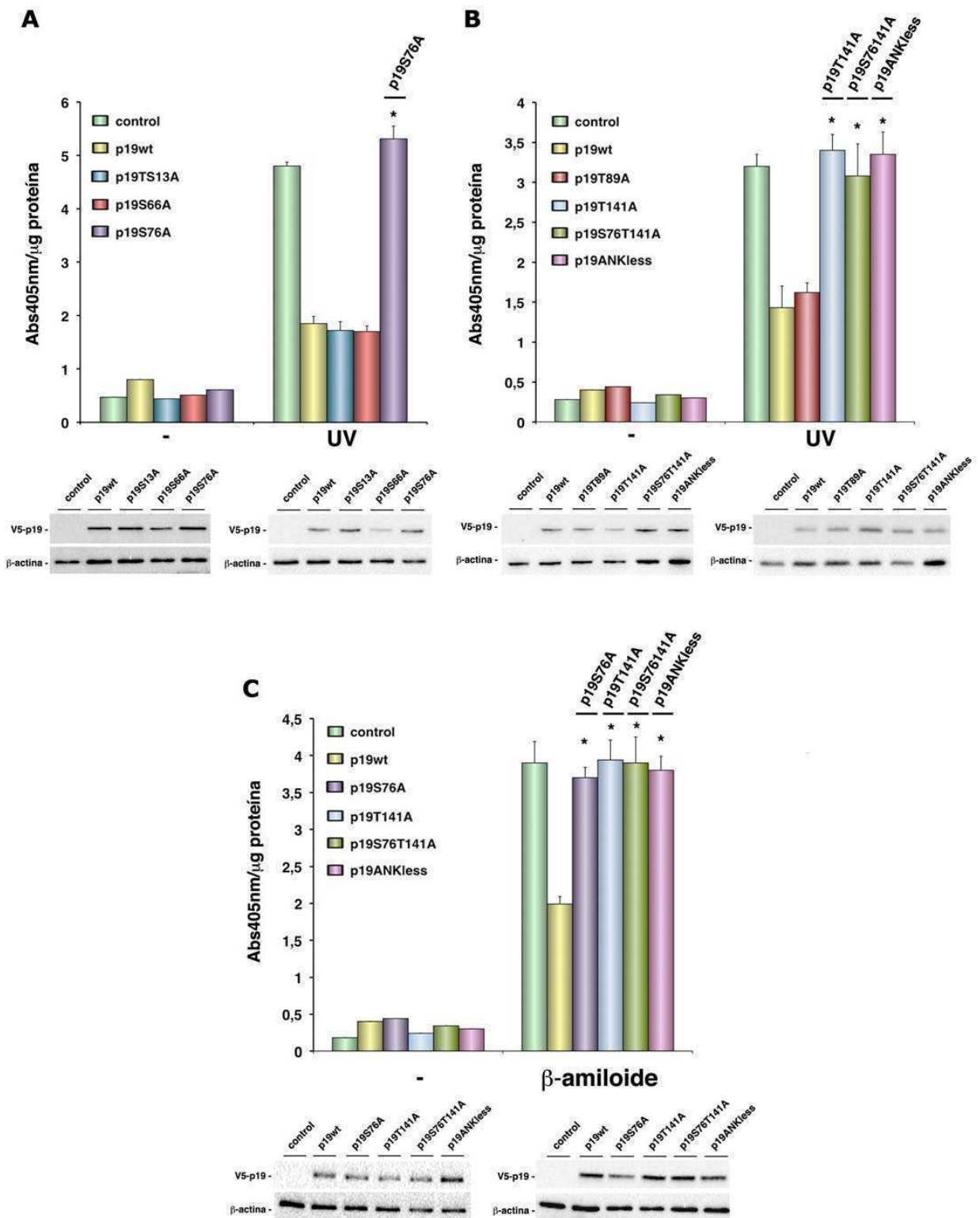


Figura 39. El efecto protector de p19 contra la apoptosis es dependiente de su función en la reparación del ADN. Células WI-38 fueron co-transfectadas con p19wt o con las mutantes indicadas de p19 y el vector pBABE con resistencia a puomicina. Las células resistentes a puomicina fueron irradiadas con 4 mJ/cm² de UV (A y B), o dañadas con β-amiloid (10 μM) (C), e incubadas por 24 horas. La actividad de caspasa-3 fue determinada. La figura muestra la media ± D.E. de 3 ensayos independientes por triplicado. El Test de Student fue utilizado para comparar las muestras de p19wt con sus mutantes. (* P<0,01). La expresión de las diferentes proteínas fue evaluada por Western blot.

3.5 La fosforilación de p19 no está involucrada en su función inhibitoria del ciclo celular

Hemos demostrado que p19 requiere de la fosforilación en serina 76 y en treonina 141 para participar en la reparación del ADN. Nos preguntamos si estos sitios de fosforilación también estarían involucrados en la función de p19 de inhibir el ciclo celular.

Células WI-38 fueron co-transfectadas con p19wt ó con las mutantes de fosforilación y pBABE. La capacidad inhibitoria de p19 y de las mutantes sobre la progresión del ciclo celular se evaluó por incorporación de ³H-timidina. Las células transfectadas fueron seleccionadas con puomicina por 60 horas. Luego de la selección, las células fueron incubadas por 4 horas con ³H-timidina y posteriormente la incorporación de marca radiactiva fue cuantificada.

En primer lugar, para la mutante estructural p19ANKless podemos observar que que, si bien su sobreexpresión inhibe significativamente la proliferación celular respecto de las células control, los niveles de incorporación de marca radiactiva triplican los observados para p19wt (**Figura 40**). Este hecho sugiere que la pérdida del último dominio ankirina, además de eliminar la función de reparación, afecta la unión de p19 con CDK4/CDK6 y consecuentemente la inhibición del ciclo celular. Sin embargo, no podemos discriminar en base a estos resultados, si la eliminación de un dominio ankirina completo en la proteína modifica el plegamiento de los demás dominios o si, de hecho, el cuarto dominio ankirina es requerido para la interacción con las CDKs.

En cuanto a las mutantes de fosforilación estudiadas (p19S13A, p19S66A, p19S76A, p19T89A, p19T141A, p19S76T141A) observamos que todas ellas arrestaron el ciclo celular en forma similar a p19wt (**Figura 40**). Esto implica que ninguno de los sitios mutados está ligado a la función inhibitoria del ciclo celular. Consecuentemente, la fosforilación de p19, a pesar de ser necesaria en la función de reparación del ADN, no es requerida para cumplir con su función antiproliferativa. En otras palabras, las mutantes en p19S76A y p19T141A que pierden la función vinculada a la reparación conservan intacta la capacidad de inhibir la proliferación celular.

Esta observación apoya también el resultado obtenido en la **Figura 17** en la cuál postulamos que, la función de p19 en la reparación no está relacionada con su capacidad de inhibir a CDK4 y de conferir a las células mayor tiempo para la reparación del ADN.

Concluimos que ninguno de los dos sitios serina 76 o treonina 141 es necesario para que p19 inhiba la progresión del ciclo celular de forma eficiente, siendo esta función independiente de la función en la reparación del ADN.

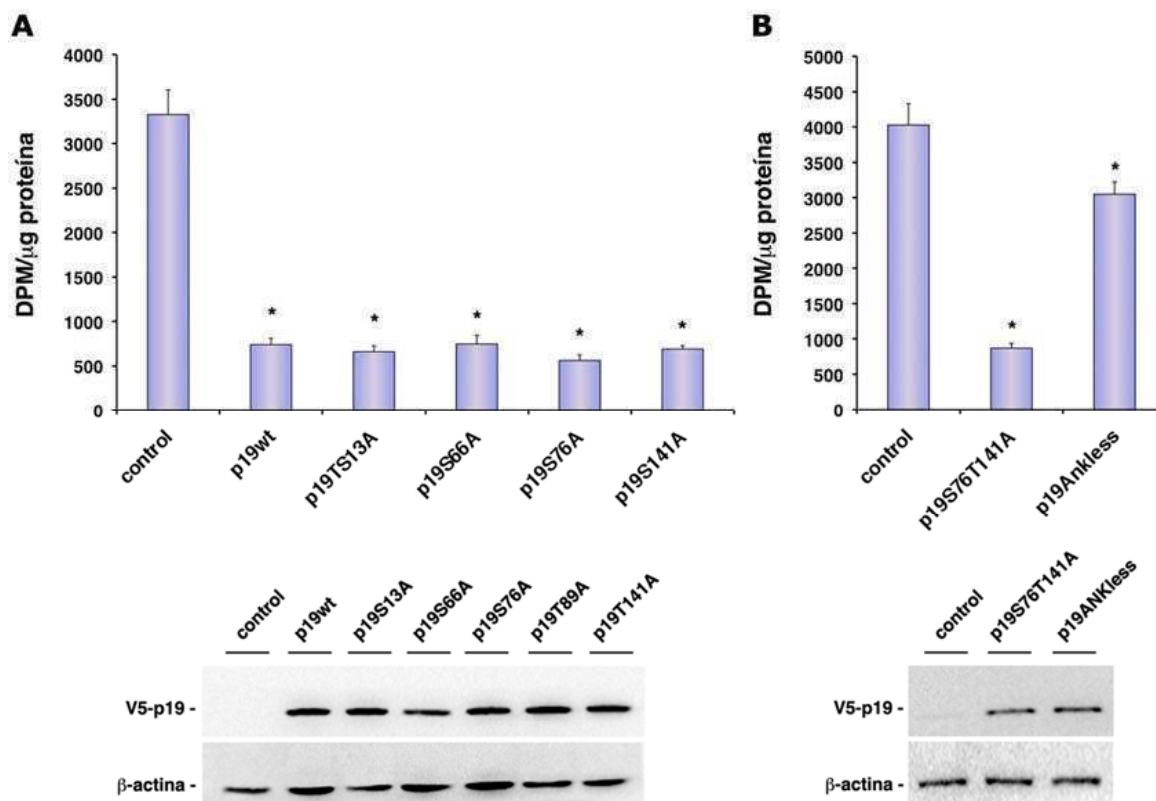


Figura 40. Ninguno de los sitios de fosforilación potenciales en p19 son requeridos en la función inhibitoria del ciclo celular. Células WI-38 fueron co-transfectadas con p19wt ó con las mutantes (p19S13A, p19S66A, p19S76A, p19T141A, p19S76T141A y p19ANKless) y el vector pBABE con resistencia a puomicina. Luego de 24 horas la selección de las células transfectadas fue iniciada por el agregado de puomicina y mantenida por 60 horas. Pasado este tiempo, todos los cultivos fueron incubados con 1 μ Ci [H^3]timidina y su incorporación evaluada 6 horas más tarde. La figura muestra la media \pm D.E. de los valores obtenidos en 2 ensayos independientes por triplicado. El Test de Student fue utilizado para comparar las muestras controles con p19wt o sus mutantes. (* $P < 0,01$). La expresión de las diferentes proteínas fue evaluada por Western blot con un anticuerpo anti-V5.

3.6 Las mutantes de p19 que simulan el estado fosforilado de la proteína tienen igual capacidad de reparar el ADN que p19 salvaje

Los efectos causados por la fosforilación de un sitio serina/treonina pueden ser a veces simulados reemplazando el aminoácido fosforilable por ácido glutámico o

aspártico (Li et al., 2008; Park et al., 2006). La carga negativa que conllevan estos aminoácidos puede por lo general suplir la función que desempeña el grupo fosfato en una proteína.

Planteamos que si p19 requiere de la fosforilación en serina 76 y treonina 141 para llevar a cabo su función en la reparación del ADN entonces la mutación de estos residuos por ácido glutámico podría imitar el efecto de la fosforilación. Construimos dos mutantes de p19, una reemplazando la serina 76 por ácido glutámico (p19S76E) y la otra reemplazando tanto a la serina 76 como a la treonina 141 por este mismo aminoácido (p19S76ET141E). p19wt o las mutantes fueron transfectadas con en fibroblastos WI-38 para medir la capacidad de reparación celular por UDS.

Nuestros resultados muestran que las células que sobreexpresan la mutante p19S76E, la cual no puede ser fosforilada en este sitio, alcanzaron niveles de reparación similares a los observados en las células que sobreexpresan p19wt con ambos tipos de daño (**Figura 41**). El reemplazo por ácido glutámico en este sitio recupera la actividad que se encuentra afectada en la mutante p19S76A (**Figura 38**). Sumado a esto, las células transfectadas con la mutante p19S76ET141E, sin posibilidad de ser fosforilada en los sitios descritos, también mostraron igual capacidad de reparar el ADN que aquellas sobreexpresando p19wt (**Figura 41**).

Concluimos, entonces, que las mutantes que imitan la fosforilación de p19 tienen la misma capacidad de mejorar la reparación que p19wt cuando son sobreexpresadas, y consecuentemente, estos resultados apoyan fuertemente a los aminoácidos serina 76 y treonina 141 descritos hasta aquí como los sitios de fosforilación.

Estas evidencias son consistentes con una vía de regulación de la actividad de p19 mediada por la fosforilación de los sitios serina 76 y treonina 141 en respuesta a daño.

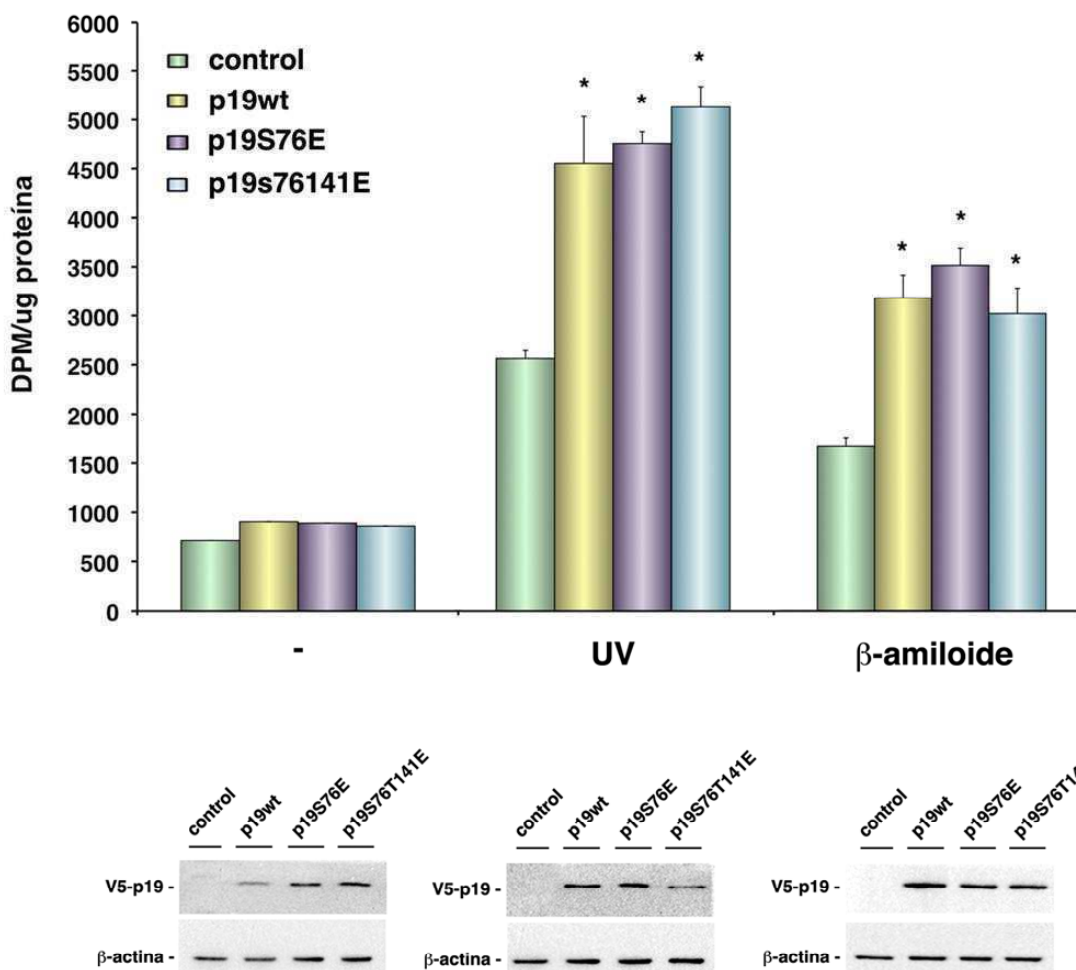


Figura 41. La mutante de p19 que imita la fosforilación en serina 76 y treonina 141 recupera la función de reparación. Células WI-38 fueron co-transfectadas con p19wt ó con las mutantes (p19S76E y p19S76T141E) y el vector pBABE con resistencia a puromicina. Luego de 24 horas la selección de las células transfectadas fue iniciada por el agregado de puromicina y además mantenidas en medio libre de arginina conteniendo 1% de suero fetal bovino durante 60 horas. Pasado este tiempo, las células fueron irradiadas con 4 mJ/cm² de UV, o dañadas con β-amiloide (10 μM), e incubadas con 1 mCi [3H]timidina. Los lisados celulares cosechados 10 horas luego del daño fueron analizados por ensayos de síntesis de ADN no programada (UDS). La figura muestra la media ± D.E. de los valores obtenidos en 2 ensayos independientes por triplicado. El Test de Student fue utilizado para comparar las muestras controles con p19wt ó sus mutantes. (*P<0,01). La expresión de las diferentes proteínas fue evaluada por Western blot con un anticuerpo anti-V5.

3.7 La serina 76 y la treonina 141 son los únicos sitios de fosforilación en p19 en respuesta a daño

Hemos descrito que la fosforilación de p19 en respuesta a daño genotóxico sería secuencial, participando en primer lugar la quinasa CDK2 ó CDK5 en serina 76 y luego PKA sobre la treonina 141. También demostramos que ambos sitios son necesarios en la función de p19 de reparar el ADN y que las mutantes p19S76E y p19S76ET141E tienen la misma capacidad de p19wt de participar en la reparación.

Teniendo en cuenta estas observaciones planteamos que si la serina 76 es efectivamente fosforilada y la mutante p19S76E imita esta modificación post-traducciona, entonces, p19S76E podrá ser fosforilada en la treonina 141 de acuerdo a la hipótesis de la fosforilación secuencial.

Transfectamos las mutantes p19S76E y p19S76T141E en células BHK-21 para realizar ensayos de marcación metabólica utilizando luz UV como dañador. En el análisis de los resultados observamos que, la mutante p19S76E recuperó la capacidad de ser fosforilada que había sido perdida en la mutante p19S76A (**Figura 42 y Figura 22**). Esto indica que el reemplazo de serina 76 por ácido glutámico, permite eventos posteriores de fosforilación. Es interesante observar que p19S76E no fue fosforilada en ausencia de UV, señalando la necesidad de una vía activa de respuesta al daño para que esto ocurra. Es relevante destacar que no observamos fosforilación en la mutante S76ET141E. El hecho de encontrar que esta mutante no es fosforilada por daño, a pesar de tener la misma capacidad de p19 de participar en la reparación del ADN, implica, por un lado, que la treonina 141 es efectivamente un sitio fosforilado en p19, porque su mutación por ácido glutámico elimina la fosforilación observada para la mutante p19S76E. Por otro lado, esta observación junto con la fosforilación de p19S76E apoyan fuertemente la hipótesis de secuencialidad puesto que la treonina 141 para ser fosforilada requeriría primero de la fosforilación en serina 76, que en este caso es imitada por ácido glutámico. Y por último, sugiere fuertemente que serina 76 y treonina 141 son los únicos sitios fosforilados en p19 en respuesta a genotóxicos. Habíamos visto que el reemplazo de treonina 141 por alanina disminuía la fosforilación pero no la eliminaba completamente (**Figura 22**). Este resultado sería el producto de la fosforilación en serina 76 luego del daño, pero además, podría estar manifestando la fosforilación de algún otro residuo no identificado hasta el momento. Siguiendo el mismo razonamiento, la fosforilación observada en la mutante p19S76E (**Figura 42**) correspondería a la actividad de PKA sobre la treonina 141, pero no podríamos descartar a partir de este resultado la fosforilación, además, en otro sitio diferente a los evaluados hasta aquí (S13, S66, S76, T89, T141). Sin embargo, el resultado que

muestra que la mutante S76ET141E no es fosforilada en respuesta a daño, postularía a los sitios serina 76 y treonina 141 como los únicos residuos fosforilados en p19 y necesarios en la actividad de reparación del ADN.

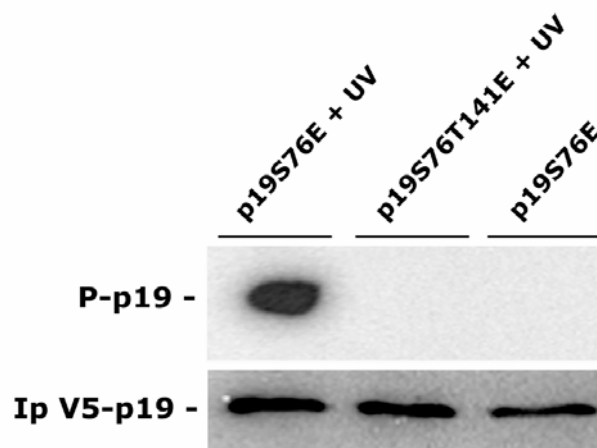


Figura 42. La mutante p19S76E recupera la capacidad de ser fosforilada. Células BHK-21 fueron transfectadas con p19S76E ó p19S76T141E. 24 horas luego de la transfección fueron incubadas con 0,5 mCi de ^{32}P -ortofosfato de sodio durante 3 horas y tratadas posteriormente con radiación UV (4 mJ/cm²). Cantidades iguales de proteínas (180 µg) de las muestras recolectadas 1 hora luego del daño fueron inmunoprecipitadas usando un anticuerpo anti-V5. Los complejos inmunes fueron sujetos a SDS-PAGE 12% y la fosforilación fue analizada a través de la utilidad Storm Phosphoimager Scanner. Los niveles de las mutantes de 19 en los extractos utilizados en la inmunoprecipitación fueron analizados por Western blot. La figura es representativa de 3 ensayos independientes.

3.8 Ambos sitios, serina 76 y treonina 141, son fosforilados en el citoplasma luego de daño al ADN

Los resultados representados en la **Figura 35** demuestran que la fosforilación de p19 es iniciada en el citoplasma, es decir, que CDK2 ó CDK5 fosforilarían a p19 en serina 76 en este espacio subcelular. Buscando identificar la localización subcelular de las fosforilación en treonina 141 empleamos ensayos de marcación metabólica en células BHK-21 transfectadas con la mutante S76E. Encontramos que a los 20 minutos de inducido el daño la fosforilación de esta mutante se observa en el espacio citoplasmático. Este resultado señala que en esta localización subcelular ocurre, no sólo la fosforilación en serina 76, sino también la segunda fosforilación de p19 en treonina 141 (**Figura 43**). Aún más, la fosforilación de S76E se observa en el núcleo

más rápidamente que la fosforilación de p19wt. A los 20 minutos ya podemos visualizar translocación nuclear de S76E, mientras que esta relocalización en p19wt es observada a los 60 minutos (**Figuras 35 y 36**).

Concluimos que ambos aminoácidos, la serina 76 y la treonina 141, son fosforilados en el citoplasma y que, además, la simulación de la fosforilación en p19S76E hace más rápido el pasaje de la proteína del espacio citoplasmático al núcleo.

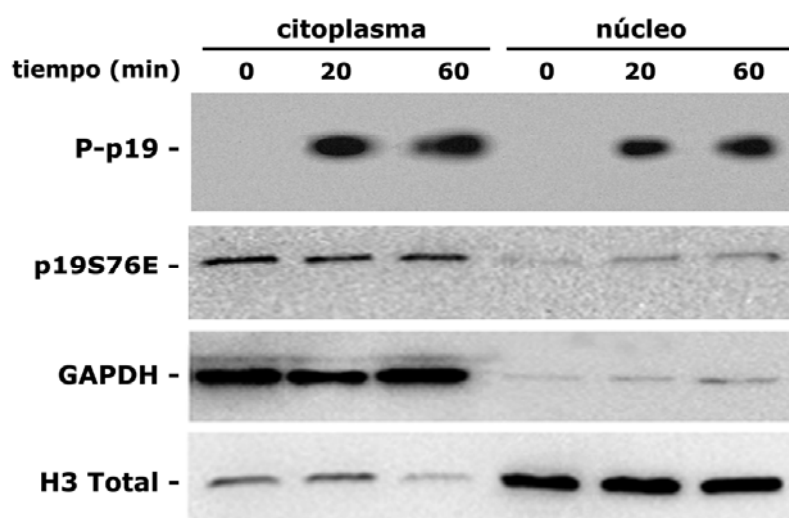


Figura 43. La fosforilación en treonina 141 ocurre en el espacio citoplasmático. Células BHK-21 fueron transfectadas con la mutante que imita la fosforilación de p19 en serina 76 (p19S76E). Las células fueron incubadas con 0,5 mCi de ^{32}P -ortofosfato de sodio durante 3 horas, 24 horas de ocurrida la transfección. Luego, fueron dañadas con radiación UV (4 mJ/cm^2). Cantidades iguales de proteínas ($200 \mu\text{g}$), de las muestras recolectadas en los tiempos indicados y fraccionadas subcelularmente, fueron inmunoprecipitadas usando un anticuerpo anti-V5. Los complejos inmunes fueron sujetos a SDS-PAGE 12% y la fosforilación fue analizada a través de la utilidad Storm Phosphoimager Scanner. Los extractos fueron analizados por Western blot utilizando un anticuerpo anti-V5. La eficiencia del fraccionamiento subcelular fue evaluada con un anticuerpo anti-GAPDH como marcador de citoplasma y otro anti-Histona H3 total como marcador de núcleo. Las figuras son representativas de 3 ensayos independientes. (C, citoplasma; N, núcleo; P-p19, proteína p19 fosforilada)

Capítulo 4: Interactores de p19

Las modificaciones post-traduccionales como la fosforilación representan una forma rápida y reversible de modular la actividad e interacción de proteínas en la célula, ya que no requieren de la síntesis o de la degradación de moléculas existentes. En base a los resultados mostrados hasta aquí, planteamos que la fosforilación de p19 podría estar involucrada en la interacción con otras proteínas relacionadas a la reparación de ADN.

En este capítulo buscamos iniciar el estudio de posibles interactores de p19 con especial interés en aquellos que pudieran estar relacionados a la respuesta frente al daño. Los resultados mostrados a continuación, fueron obtenidos a través de una estancia corta en la Unidad 624 “Stress Cellulaire” del INSERM en Marsella, Francia, bajo la dirección de los Dres. Nelson Duseti y Juan Iovanna.

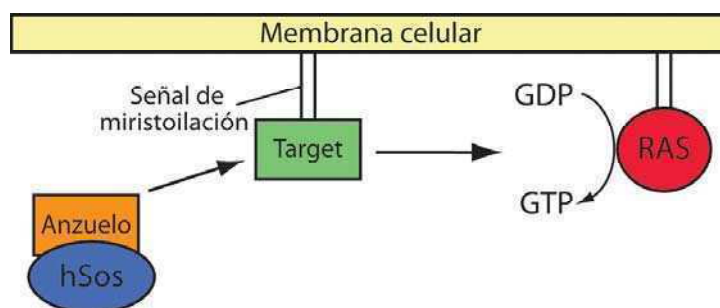
4.1 Búsqueda de interactores de p19 por ensayo de doble híbrido

4.1.1 Descripción del sistema

Como primera aproximación al estudio de interactores utilizamos la técnica de doble híbrido, en particular, el sistema de doble híbrido Cytotrap. Este sistema tiene la característica de permitir la identificación de interacciones entre proteínas en el citoplasma de las células de levaduras, en contraposición a otros métodos convencionales que emplean GAL4 y LexA en donde la interacción ocurre en el núcleo. Esta característica del sistema ofrece la posibilidad de que las proteínas sufran en el citoplasma modificaciones post-traduccionales críticas para la interacción, que no ocurrirían si la expresión fuese dirigida al núcleo. Las interacciones proteína – proteína en el citoplasma son detectadas por el reclutamiento del producto del gen Sos humano (hSos) a la membrana de la celular en donde activa la vía Ras. Este sistema usa la cepa de levaduras cdc25H la cual contiene una mutación en el gen cdc25, homólogo a hSos, que la hace sensible a ciertas temperaturas. Esta proteína es un factor intercambiador de nucleótidos de guanina que resulta esencial para la activación de la vía Ras y finalmente para la supervivencia y el crecimiento de la célula. La mutación en el gen cdc25 permite a las células crecer a 25 °C pero no a 37 °C. Esta mutación

puede ser complementada por el producto del gen hSos cuando este se localiza en la membrana celular permitiendo el crecimiento a 37°C.

El sistema Cytotrap utiliza el vector pMyr para la construcción de una biblioteca de expresión. Los genes expresados por este vector se encuentran fusionados a una señal de miristoilación que dirige y ancla las proteínas “*target*” a la membrana celular. La proteína anzuelo es expresada como una proteína de fusión con la proteína hSos a partir del vector pSos. Cuando la biblioteca de ADNc y el anzuelo son co-transformados en la cepa *cdc25H*, las únicas células capaces de crecer a 37 °C son aquellas que resultan rescatadas por la interacción entre el anzuelo y una proteína de la biblioteca reclutando hSos a la membrana celular y activando la vía Ras.



1. La proteína “*target*” fusionada a la señal de miristoilación se ancla a la membrana celular.
2. El anzuelo se une a la proteína “*target*” localizando hSos en la membrana.
3. hSos activa RAS promoviendo el intercambio GDP/GTP.
4. RAS activa la cascada de señales que permite a la cepa de levaduras mutante, *cdc25H*, crecer a 37°.

4.1.2 Determinación de interactores de p19

La secuencia humana completa de p19 fue clonada en el vector pSos para generar la proteína de fusión hSos-p19. Esta proteína de fusión fue utilizada como anzuelo en la búsqueda de interactores utilizando una biblioteca de ADNc de células Hela previamente construida en el vector pMyr. Al finalizar el estudio fueron identificados un total de 69 clones positivos. El fragmento de ADNc contenido en el vector pMyr de cada clon fue amplificado por PCR y secuenciado. Las secuencias obtenidas fueron identificadas utilizando la base de datos GenBank® (**Tabla 4**).

Tabla 4. Interactores de p19 identificados por el sistema de doble híbrido Cytotrap

Símbolo	Nombre del Gen	# de acceso	# de clones
MPHOSPH6	M-phase phosphoprotein 6	NM_005792	13
TOMM20	translocase of outer mitochondrial membrane 20 homolog	NM_014765	12
PSMD4	proteasome (macropain) 26S subunit, non-ATPase, 4	NM_002810	7
CDK4	cyclin-dependent kinase 4	NM_000075	6
ABHD12	abhydrolase domain containing 12	NM_015600	5
CCT3	chaperonin containing TCP1, subunit 3 (gamma)	NM_005998	4
ETFB	electron-transfer-flavoprotein, beta polypeptide	X71129	3
CAND1	cullin-associated and neddylation-dissociated 1	NM_018448	2
MSL1	male-specific lethal 1 homolog (Drosophila)	NM_001012241	2
IRF2BP2	interferon regulatory factor 2 binding protein 2	NM_182972	2
YL12B	myosin, light chain 12B, regulatory	NM_033546	2
GMNN	geminin, DNA replication inhibitor	NM_015895	1
BRD7	bromodomain containing 7	NM_013263	1
CCAR1	cell division cycle and apoptosis regulator 1	NM_018237	1
IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	NM_001548	1
SRP72	signal recognition particle 72kDa	AF069765	1
FTH1	ferritin, heavy polypeptide 1	NM_002032	1
HNRNPF	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	NM_001098204	1
HJURP	Holliday junction recognition protein	NM_018410	1
RWDD1	RWD domain containing 1	NM_015952	1
RABAC1	Rab acceptor 1 (prenylated)	NM_006423	1
I2	GDP dissociation inhibitor 2	D13988	1

4.1.3 Análisis de los interactores

En primer lugar, es importante notar que en la lista de posibles proteínas interactoras de p19 se encuentra CDK4, una quinasa que efectivamente interactúa con p19. Esta interacción sugiere una expresión correcta del anzuelo en el ensayo y representa un control adicional del adecuado funcionamiento del sistema.

Luego, 4 de las secuencias obtenidas (M-phase phosphoprotein 6, macropain, chaperonin containing TCP1, myosin light chain 12B regulatory) fueron descritas como falsos positivos debido a que han sido identificadas en un alto número de clones, no sólo con p19 como anzuelo, sino también, cuando proteínas no relacionadas a p19 fueron fusionadas a hSos. De las restantes proteínas enumeradas en la lista, 6 de ellas resultan de especial interés teniendo en cuenta las funciones descritas para cada una de ellas y la potencial interacción con p19.

Tres de ellas, las proteínas **bromodomain containing 7**, **geminin** y **male-specific lethal 1 homolog**, comparten la característica de pertenecer a complejos remodeladores de la cromatina. La posibilidad de que p19 sea un interactor real de estos factores remodeladores resulta particularmente atractiva porque sugeriría un

potencial modo de acción de p19 en la reparación del ADN. Hemos demostrado que la inducción y fosforilación de p19 se produce en respuesta a diferentes agentes genotóxicos que causan distintos tipos de daño y que también son reparados por diferentes mecanismos. La eficiencia de estos mecanismos también se ve influenciada por los niveles proteicos de p19 y su fosforilación. El hecho que p19 participe en mecanismos de reparación tan diversos implica que su función estaría relacionada con una respuesta primaria al daño, común a todos los genotóxicos ensayados, como podría ser la remodelación de la cromatina, entonces, p19 podría proponerse como un factor de accesibilidad.

Esta necesidad de remodelación de la cromatina está reportada para procesos vitales en la célula que requieren del acceso de factores a secuencias específicas en el ADN, y en los cuales la estructura de la cromatina altamente condensada representa una barrera a sortear. Existen diversas modificaciones que pueden ocurrir sobre las histonas que promueven la remodelación de la cromatina. Estas modificaciones están asociadas por ejemplo a la regulación de la transcripción (Berger, 2007), a la iniciación de las horquillas de replicación (Suter et al., 2007) y a la reparación del ADN. (Jha et al., 2008; Murr et al., 2006; Utley et al., 2005; Wurtele and Verreault, 2006; Zhu and Wani). La dinámica de la cromatina constituye un componente activo de la respuesta al ADN dañado puesto que la modificación de su estructura permite la accesibilidad de proteínas de reparación (Zhu and Wani, 2010). Mecanismos especializados regulan el grado de empaquetamiento de la cromatina por diferentes vías. En uno de ellos participan enzimas que introducen o eliminan modificaciones covalentes en las colas de las histonas (como las Histona Acetil transferasas, HATs; e Histonas Desacetilasas, HDACs), mientras que en otro, diferentes complejos de proteínas utilizan la energía de la hidrólisis de ATP para alterar la posición o la composición de los nucleosomas (como el complejo SWI/SNF) (Berger, 2002; Lydall and Whitehall, 2005; Saha et al., 2006).

Entre las modificaciones covalentes posibles se encuentra la acetilación de histonas, para la cual fue demostrada su participación en la respuesta al daño al ADN (Costelloe et al., 2006). Se ha reportado que los agentes dañadores del ADN, tales como la radiación ionizante, la luz UV, hidroximetilmetano sulfonato, inducen la acetilación de la histona H3 en células humanas y que la HAT responsable de esta acción es CBP/p300 (Lydall and Whitehall, 2005). Estas histonas acetiladas colocalizan con H2AX γ sugiriendo que la acetilación ocurre en los sitios de daño al ADN. Fue reportado que otro complejo HAT, Tip 60, es reclutado a los sitios de roturas doble cadena, donde se une y acetila a la histona H4 promoviendo el reclutamiento de proteínas de reparación como 53BP1 y RAD51 (Das et al., 2009)

Los tres probables interactores de p19 que se describen a continuación están relacionados con el remodelamiento de la cromatina y por este motivo resultan de interés en este estudio.

Bromodomain containing 7 (BRD7)

BRD7 fue identificada por primera vez como una proteína de unión al Factor Regulador del Interferón 2 (*Interferon Regulatory Factor-2*, IRF-2). La familia de factores de transcripción IRF participa en la defensa antiviral, en la respuesta inmune y en la regulación del crecimiento celular. IRF-2 es descrito como una oncoproteína. (Nguyen et al., 1997). La proliferación celular promovida por IRF-2 se encuentra mediada por la activación transcripcional del gen de la histona H4 (Vaughan et al., 1995; Vaughan et al., 1998). La localización subcelular de BRD7 fue descrita como predominantemente nuclear observando una colocalización con histonas H3 y H4 hiperacetiladas, en regiones de la cromatina transcripcionalmente activa. (Staal et al., 2000). En células de carcinoma nasofaríngeo (NPC), la proteína BRD7 se encuentra significativamente disminuida (Zhou et al., 2004). La sobreexpresión ectópica de BRD7 en una línea celular de NPC inhibió el crecimiento y la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la fase S por medio de la modulación transcripcional de algunos genes relacionados con la regulación del ciclo celular, incluyendo a E2F3 (Peng et al., 2006).

El dominio de bromo es requerido para la unión a la lisina 14 de la histona H3. La unión a través de este dominio es esencial para la regulación transcripcional que ejerce BRD7 sobre el promotor de E2F3 y sobre la inhibición del ciclo celular. La sobreexpresión de BRD7 no genera modificaciones en los niveles de acetilación de H3 por lo que el remodelamiento de la cromatina, y no la modificación de histonas, es el principal mecanismo de BRD7 para mediar la transcripción génica. (Peng et al., 2006)

Sumado a esto, recientemente BRD7 fue descrito como un componente del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF en células madre embrionarias (ESCs) (Kaesler et al., 2008),

Male-specific lethal 1 homolog (MSL1)

MSL1 (previamente conocido como LOC339287) codifica una de la cinco proteínas que forman un complejo altamente conservado denominado MSL (*male-specific lethal*) con actividad de histona acetil-transferasa (HAT). El complejo MSL fue descrito por primera vez en *Drosophila* y la mutación de cualquiera de los 5 miembros de este complejo (MSL1, MSL2, MSL3, MLE, MOF) resulta letal en machos de este género

(Smith et al., 2005). Recientemente fue descrito un complejo de histona acetil-transferasas en humanos que contiene homólogos del complejo MSL en *Drosophila* (MSL1, MSL2, MSL3 y MOF). Este complejo tiene alta especificidad por la lisina 16 de la histona H4, la cual juega un papel crucial en la regulación de la remodelación de la cromatina y la expresión génica. Más aún, la pérdida de la acetilación en la lisina 16 de H4 es una de las características comúnmente observadas en el cáncer, relacionada con defectos en el plegamiento de la cromatina y la expresión alterada de genes (Fraga et al., 2005)

El complejo MSL de *Drosophila* es encontrado actuando exclusivamente sobre el cromosoma X en machos donde aumenta los niveles de expresión génica por la acetilación de dominios transcripcionales completos (Smith et al., 2001). En humanos este complejo no se asocia con un cromosoma específico y parece tener una distribución genómica ubicua (Smith et al., 2005)

MOF es el componente del complejo con actividad acetilasa y es el responsable de la acetilación en la lisina 16 de H4 (Smith et al., 2005). Varios estudios han demostrado que la pérdida de MOF en células de mamíferos tiene varias consecuencias como el arresto del ciclo celular en G2/M, defectos morfológicos a nivel nuclear, aberraciones cromosómicas espontáneas, transcripción reducida de ciertos genes y una respuesta al daño al ADN defectuosa luego de radiación ionizante (Rea et al., 2007). MOF también está involucrado en la activación de ATM en respuesta a daño al ADN y la acetilación de p53 por MOF influencia la decisión celular de inducir apoptosis por sobre el arresto del ciclo celular (Sykes et al., 2006; Sykes et al., 2009). Se encontró también que MSL1 se une a 53BP1 (Gironella et al., 2009). 53BP1 se une al dominio de unión al ADN de p53 y rápidamente forma *foci* discretos en respuesta a la radiación gamma (Mochan et al., 2004).

Por último, recientemente fue propuesto un mecanismo mediante el cual la proteína 53BP1 reclutaría a MSL1 a los alrededores del ADN dañado y que, luego, el complejo MSL aumentaría la acetilación en lisina 16 de histona H4. La modificación de histonas conduciría a cambios estructurales que inducirían la remodelación de la cromatina y la relajación del ADN permitiendo a la maquinaria de reparación acceder a los sitios dañados (Gironella et al., 2009).

Geminin, ADN replication inhibitor (GMNN)

La proteína geminina fue caracterizada en dos estudios funcionales independientes en *Xenopus laevis* y, subsecuentemente, fue caracterizada como una molécula de función dual con roles en el mantenimiento de la integridad del genoma, a través de la

regulación del licenciamiento de la replicación del ADN, (McGarry and Kirschner, 1998) y en el control del destino de la células neurales durante el desarrollo de la embriogénesis (Kroll et al., 1998).

Por un lado se demostró que geminina evitaba la reiniciación de la replicación en un ciclo celular para mantener la integridad cromosómica y la euploidía. Los niveles de geminina aumentan durante la fase S y se asocia con Cdt1, miembro del complejo de licenciamiento, durante las fases S, G2 y M para evitar la reiniciación de la replicación. En anafase es degradada o inactivada para permitir una nueva ronda de replicación. (McGarry and Kirschner, 1998; Tada et al., 2001; Wohlschlegel et al., 2000) Al mismo tiempo fue identificada, en otros estudios en *Xenopus* y *Drosophila*, como una molécula que participa en el destino de las células neurales. (Kroll et al., 1998; Quinn et al., 2001). En *Xenopus*, geminina es altamente expresada al inicio de la gastrulación en una región que dará inicio a la placa neural y que abarca la población celular de progenitores neurales en proliferación (Kroll et al., 1998). La pérdida de la función de geminina inhibe la formación de tejido neural (Kroll et al., 1998). La sobreexpresión de geminina también induce células neuronales ectópicas mientras que, embriones mutantes en geminina, presentan deficiencias neuronales (Quinn et al., 2001). Esta proteína interacciona con los factores de transcripción Six3 y Hox y puede antagonizar las actividades transcripcionales de estos para regular la diferenciación celular. (Del Bene et al., 2004; Luo and Kessel, 2004; Luo et al., 2004).

Esta capacidad está relacionada con interacciones de proteínas *Polycomb* que regulan la estructura de la cromatina para reprimir la expresión génica.

Las actividades transcripcionales de geminina y la interacción con otras proteínas regulan la estructura de la cromatina. Fue descrita la interacción entre geminina y Brg1, la subunidad catalítica del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF, que antagoniza la transcripción dependiente de Brg1 y regula la transición entre proliferación y diferenciación durante la neurogénesis (Seo et al., 2005).

La proteína descrita a continuación resulta interesante como probable interactor de p19 porque, entre otras funciones, juega un rol fundamental en la regulación del reconocimiento inicial del daño por UV y en el reclutamiento de miembros de la maquinaria NER.

Cullin-associated and neddylation-dissociated 1 (CAND1)

Cullin-associated and neddylation-dissociated (CAND) fue originalmente identificada como una proteína interactora de TATA-binding protein (TBP) por lo cual fue denominada TBP-interacting Protein 120 (TIP120) (Yogosawa et al., 1996).

La familia TIP120 incluye 2 miembros, TIP120A/CAND1 y TIP120B/CAND2. La proteína CAND1 facilita la transcripción conducida por todas las clases de RNA polimerasa (Kayukawa et al., 1999; Makino et al., 1999). Por otro lado, CAND1 fue también identificada como una proteína que interactúa con la familia de proteínas llamada Cullin (Liu et al., 2002; Min et al., 2003; Zheng et al., 2002a).

Las proteínas de la familia Cullin se asocian a otras proteínas y trabajan como E3-ubiquitina ligasas (Cardozo and Pagano, 2004). Cullin 1 (CUL1) forma un complejo junto con Skp1 y F-box denominado complejo SCF (Lyapina et al., 1998; Zheng et al., 2002b). En el complejo, una lisina específica en la región C-terminal de CUL1 es covalentemente modificada por Nedd8 en un proceso llamado nedilación (conjugación de Nedd8 a la lisina de Cullinas). La nedilación facilita la asociación de CUL1 con la enzima E2 estimulando la actividad de ligación. (Furukawa et al., 2000; Wu et al., 2000) CAND1 se une a CUL1 no nedilada e inhibe el ensamblado de proteínas adaptadoras asociadas a CUL1, regulando negativamente la actividad del complejo SCF (Min et al., 2003; Min et al., 2005; Zheng et al., 2002a).

CAND1 puede inhibir el ensamblado de otros complejos de ubiquitinación formado por cullinas diferentes a CUL1, como por ejemplo el compuesto por cullin-4A (CUL-4A)(Goldenberg et al., 2004; Hu et al., 2004; Oshikawa et al., 2003; Zheng et al., 2002a). Este complejo formado por CUL-4A, que resulta inhibido por CAND1, estimula la degradación de DDB2, un miembro del grupo de proteínas de unión al ADN dañado (Damaged DNA binding proteins, DDBs) que juega un papel crítico en el reconocimiento inicial del daño por UV mediando el reclutamiento de factores de la maquinaria NER. (Chen et al., 2006; Chen et al., 2001; Nag et al., 2001). Resulta llamativa la existencia de una vía proteolítica que limite la capacidad de reparación celular, tanto a través del control de los niveles proteico de DDB2 como también limitando la duración de la asociación de DDB2 al ADN dañando. Sin embargo, considerando que las proteínas DDBs permiten el reconocimiento de una gran variedad de distorsiones en las hebras de ADN, altos niveles de DDBs no son deseables puesto que pueden llevar a la unión de las mismas, a estructuras del ADN naturales iniciando la reparación de secuencias no dañadas (Hanawalt et al., 2003). Por lo tanto, aunque la estabilización de las DDBs es favorable para aumentar la actividad NER, la capacidad de estas proteínas de reconocer una amplia gama de estructuras en el ADN

resalta el requerimiento de una regulación precisa de los niveles de DDBs para alcanzar un balance entre una actividad NER deficiente o excesiva. La proteína CAND1 a través de la inhibición de la actividad de ubiquitinación de CUL-4A participa en el mantenimiento de este balance. (Chen et al., 2006).

Los dos últimos interactores de p19 descritos a continuación, presentan funciones en la regulación de la transcripción, sus niveles inhiben o estimulan la apoptosis inducida por diferentes estímulos y una de ellas participa en la regulación de genes propios del ciclo celular.

Interferon regulatory factor 2 binding protein 2 (IRF2BP2)

Las proteínas IRF2BP1 e IRF2BP2 fueron identificadas por su unión al factor IRF-2. Llamativamente, otro potencial interactivo de p19, BRD7, también se asocia a IRF-2. IRF2BP2 es una proteína nuclear que se une al dominio represor C-terminal del IRF-2 e inhibe tanto la transcripción basal como la transcripción activada por un estímulo. IRF2BP1 e IRF2BP2 no presentan homología con otros reguladores transcripcionales conocidos por lo que fueron definidos como una nueva familia de proteínas co-represoras. (Childs and Goodbourn, 2003).

Un trabajo reciente describe a IRF2BP2 como una proteína cuyo gen es regulado directamente por p53. La regulación positiva de IRF2BP2 luego de tratar a diferentes tipos celulares con actinomicina resulta dependiente de p53. El aumento en la expresión de IRF2BP2 ocurre en paralelo a la regulación negativa de IRF-2. IRF2BP2 promueve el arresto del ciclo celular e interfiere con la apoptosis mediada por p53 inducida por doxorubicina. Cuando IRF2BP2 es silenciado, la apoptosis inducida por estrés y mediada por p53 resulta aumentada. Por el contrario, la sobreexpresión de IRF2BP2 disminuye la inducción de apoptosis. (Childs and Goodbourn, 2003).

Cell division cycle and apoptosis regulator 1 (CCAR1)

CCAR1 fue descrita como una proteína inductora de apoptosis en respuesta a diversos tipos de agentes incluyendo adriamicina. Niveles reducidos de CCAR1 resultan en la inhibición de la apoptosis inducida por adriamicina, mientras que la expresión aumentada provoca niveles elevados de p21 y apoptosis. CCAR1 también interactúa con la proteína 14-3-3 y causa la disminución de la expresión de genes regulatorios del ciclo celular incluyendo c-Myc y ciclina B1. La pérdida de c-Myc

sensibiliza las células a la apoptosis por CCAR1, mientras que la expresión de c-Myc o 14-3-3 inhibe la apoptosis dependiente de este factor. Por lo tanto, la apoptosis inducida por este factor involucra el secuestro de 14-3-3. La disminución en los niveles de CCAR1 conduce a la expresión alterada de múltiples genes regulatorios del ciclo celular. (Rishi et al., 2003). CCAR1 es activada por fosforilación en tirosina 192 y, posteriormente, promueve la apoptosis por la activación de p38MAPK y caspasa-9 (Rishi et al., 2006).

La expresión de CCAR1 se encuentra disminuida en cáncer de mama y sus niveles se correlacionan, inversamente, con el grado de severidad de dicho tumor. La expresión ectópica de CCAR1 inhibe el crecimiento de estas células cancerígenas en parte por la activación de la vía apoptótica. En aquellos tipos de cáncer de alto grado, que están usualmente pobremente diferenciados, se observan niveles reducidos de CCAR1, principalmente por metilación de su promotor (Zhang et al., 2007). CCAR1 regula la expresión de genes clave para la proliferación (Kim et al., 2008).

Si bien el estudio y la confirmación de la interacción *in vivo* entre p19 y estos candidatos es un objetivo pendiente en este trabajo de tesis, creemos que el interés en los 6 interactores descritos se encuentra fuertemente fundamentado. Por esto, proponemos, que la continuación del trabajo en esta línea colaborará en descifrar finalmente el/los mecanismo/os de acción involucrados en la función de p19 ligada a la reparación del ADN y al mantenimiento de la integridad del genoma.

Conclusiones

- La proteína p19 tiene un función en la reparación del ADN, la cual es independiente de su función inhibitoria de las quinasas CDK4/CDK6.
- p19 es necesaria para el mantenimiento de la integridad del genoma y en la supervivencia celular.
- p19 es fosforilada en respuesta a genotóxicos en serina 76 y en treonina 141 de forma secuencial. CDK2/5 y PKA son señaladas como las responsables de la fosforilación directa en estos sitios respectivamente.
- La fosforilación de p19 ocurre en el citoplasma y la serina 76 es necesaria para su translocación al núcleo luego de daño.
- La fosforilación, tanto en serina 76 como en treonina 141, resultan críticas en la función de reparación del ADN. Por el contrario no son necesarias para su función inhibitoria de CDK4/CDK6.
- El análisis de los interactores de p19 permite sugerir la participación de esta proteína en los complejos remodeladores de la cromatina necesarios para permitir el acceso de las maquinarias de reparación a los sitios de daño.

DISCUSIÓN

Discusión

El mantenimiento de la integridad del genoma es de vital importancia para la supervivencia de un organismo en condiciones adecuadas. El ADN está expuesto a sufrir diversos tipos de daños que pueden ser generados por factores exógenos ó endógenos como las especies reactivas de oxígeno, los agentes alquilantes y metilantes, radiación ionizante y UV, y errores estocásticos que pueden ocurrir durante la replicación del ADN y la recombinación. La célula responde a la presencia de daño en el ADN activando puntos de control del ciclo celular y mecanismos de reparación. Sin embargo, cuando el daño resulta muy severo para ser reparado, la célula dañada es eliminada por apoptosis.

El presente trabajo está vinculado con la respuesta celular frente al daño genotóxico y en el mismo se desarrollaron cuatro objetivos principales. El primero consistió en analizar la participación de p19 en la respuesta al daño al ADN y en la supervivencia celular. En el segundo, estudiamos la ocurrencia de procesos de fosforilación sobre p19 en respuesta al daño. En tercer lugar evaluamos si la fosforilación de p19 tiene alguna relevancia fisiológica en la respuesta celular al daño genotóxico. Y por último, buscamos posibles interactores de p19 ligados al rol de reparación del ADN.

1. Función de p19 en la respuesta al daño al ADN y en la supervivencia celular

1.1 Inducción de p19 en respuesta a daño por UV

Hemos mencionado previamente que p19 se expresa en alto niveles en órganos específicos, como cerebro y testículo. En la primera parte del trabajo utilizamos una línea celular establecida a partir de testículo de ratón, denominada MA-10. Describimos que en esta línea celular tanto los niveles de ARNm como de proteína de p19 varían periódicamente a lo largo del ciclo celular, del mismo modo que fue reportado por otros autores en otros tipos celulares estudiados (Guan et al., 1996; Hirai et al., 1995). Su expresión es baja en G0/G1 y tiene un pico al final de G1 y en la fase S. La periodicidad de la proteína p19 durante el ciclo celular está regulada en parte por el mecanismo de degradación dependiente de ubiquitina/proteasoma permitiendo que la abundancia de la proteína siga los cambios en la expresión del mensajero (Thullberg et al., 2000). Los mecanismos que determinan la expresión

cíclica del gen de p19 no fueron aún descriptos. Sin embargo, resultados de nuestro laboratorio postulan a un factor de la familia E2F en esta regulación.

Luego, hallamos que la irradiación UV en las células MA-10 induce cambios en el status de p19. Tanto los niveles de ARNm como los de la proteína p19 aumentaron significativamente luego del daño. Este hecho fue observado en otros tres tipos celulares evaluados (BHK-21, WI-38 y cultivos primarios de células de Leydig de ratón) y también en líneas no analizadas en este trabajo como la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y y HeLa de cáncer de cérvix (Ceruti et al., 2005) por lo cual esta regulación positiva de p19 parece ser un fenómeno general en respuesta al daño. En eucariotas superiores fue descrita la expresión de 4 INK4 estructuralmente relacionadas e igualmente potentes como inhibidores de CDK4/6 ((Pei and Xiong, 2005; Sherr and Roberts, 1999). Llamativamente, nuestros resultados mostraron que solamente la expresión de una de esas INK4, p19, es inducida en respuesta a UV. Este hecho podría ser explicado por un mecanismo de regulación génica diferencial de los miembros de esta familia. El análisis *in silico* de la región regulatoria 5' proximal del gen de p19 reveló sitios de alta homología para el factor E2F. Fue reportado que E2F1 es inducido por varios agentes dañadores del ADN incluyendo luz UV y drogas quimioterapéuticas. Esta inducción resulta rápida y dependiente de la actividad de las quinasas ATM/ATR que específicamente fosforilan a E2F1 conduciendo a la estabilización de la proteína (Lin et al., 2001; Stevens and La Thangue, 2004). Sumado a esto, en un trabajo publicado recientemente por nuestro laboratorio hemos descrito que, en respuesta a agentes genotóxicos, el aumento en los niveles de E2F1 es consecuencia, no solo de la estabilización de la proteína, sino también de la activación a nivel transcripcional de su gen (Carcagno et al., 2009). Aún más, resultados no publicados demuestran que la inducción de p19 en respuesta a radiación UV es dependiente de E2F1 y que este factor es crítico en esta regulación.

1.2 p19 en la respuesta al daño

La inducción de p19 en respuesta a daño en el ADN por radiación UV llevó a plantear la posibilidad de la participación de p19 en la reparación de estas lesiones. Este punto fue evaluado en profundidad mediante 4 estrategias diferentes; ensayos de HCR, experimentos de UDS, detección de estructuras tipo CPD por inmunoquímica y análisis a nivel de células individuales por ensayos del cometa. Demostramos que la sobreexpresión de p19 aumenta significativamente la capacidad de reparación del ADN y además describimos que la deficiencia de p19 muestra el efecto inverso sobre la reparación.

Como hemos mencionado, NER es el mecanismo de reparación del ADN responsable de la remoción de los aductos de ADN producidos por la luz UV, por cisplatino y por ciertos carcinógenos ambientales (Friedberg, 2001; Sancar et al., 2004; Sancar and Reardon, 2004). El mecanismo NER comprende dos vías: reparación acoplada a transcripción (TCR), la cual remueve el daño en regiones transcribibles del genoma; y la reparación genómica global (GGR), la cual elimina el daño en el resto de la cromatina (Rubbi and Milner, 2003). Además de amenazar la integridad del genoma, los daños en el ADN obstruyen la transcripción, y el arresto de las ARN polimerasas, provocado por estas lesiones, resulta en la activación de la vía TCR que finalmente elimina el daño (Sarker et al., 2005).

El ensayo de HCR nos permitió establecer la actuación de p19 en esta vía de reparación. Dado que en la técnica de HCR las células no están sujetas a un agente dañante, sino que el daño es dirigido a un plásmido que luego es transfectado en las células, concluimos, además, que las señales gatilladas por las ARN polimerasas atascadas podrían ser suficientes para modular la función de p19 en la respuesta al daño por TCR. Por otro lado, las otras 3 técnicas mencionadas (UDS, ensayo del Cometa y evaluación de CPDs) en las cuales el genoma completo está expuesto al daño, permiten la evaluación de ambos mecanismo TCR y GGR. Los resultados de estos ensayos apoyan un rol de p19 en la reparación del ADN que no estaría circunscripto solamente a la vía TCR. Esta conclusión está basada en que los genes activamente transcritos constituyen un 5-8% del genoma de eucariontes y por lo tanto también las lesiones reparadas por TCR están limitadas a estos valores. Dado que la sobreexpresión de p19 causa aproximadamente un 60% de aumento en la reparación del ADN dañado, un 40% de aumento en los fotoproductos CPDs reparados y un incremento de aproximadamente un 65% en los niveles de reparación evaluados por el ensayo del cometa, es lógico pensar que p19 está actuando en forma más general a lo largo de todo el genoma y no sólo en las regiones transcribibles. Es importante destacar que en las células MA-10 con deficiencia en p19 se observó una reducción significativa en la reparación del ADN en los cuatro ensayos evaluados. Estos últimos resultados sugieren fuertemente un rol fisiológico de p19 en la reparación del ADN, descartando cualquier efecto artificial causado por la sobreexpresión de la proteína.

1.3 p19 en la supervivencia celular y en el mantenimiento de la integridad del genoma

La sobreexpresión de p19 no sólo mejora la reparación del ADN sino que también promueve la supervivencia celular en condiciones de estrés genotóxico. El aumento en la viabilidad celular y en la resistencia al estrés pueden ser explicados por la participación de p19 en la reparación del daño. Nuestros resultados son consistentes con esta última afirmación: p19 es inducida en respuesta a luz UV, la eficiencia en la reparación del daño es dependiente de los niveles de p19 y estos niveles modifican la supervivencia evaluada tanto por ensayos clonogénicos como por ensayos de MTT de viabilidad celular. Resultados de nuestro laboratorio obtenidos en células de neuroblastoma SH-SY5Y mostraron que la sobreexpresión de p19 disminuye la apoptosis inducida por daño (Ceruti et al., 2005). Al respecto, otros estudios realizados en ratones *knock-out* para p19 demostraron que la falta de p19 incrementa la sensibilidad celular a la muerte por apoptosis o autofagia y sugieren un posible rol de la inducción de p19 en la quimioprevención (Tavera-Mendoza et al., 2006a; Tavera-Mendoza et al., 2006b). Estos resultados apoyan la idea que postula una función de p19 en la reparación del daño cuya acción se traduciría finalmente en una mayor resistencia a la muerte inducida por agentes genotóxicos.

Cuando los daños en el ADN no son reparados previamente a la replicación pueden resultar en efectos detectables, por ejemplo, a nivel de aberraciones cromosómicas (Laurent et al., 2003). Si la sobreexpresión de p19 no estuviera actuando sobre la reparación del ADN y favoreciera de alguna forma la supervivencia celular, por ejemplo, a través de la inhibición de algún punto de control las células que escapan a una reparación del ADN eficiente serían más susceptibles a la eventual aparición de aberraciones cromosómicas. Sin embargo, encontramos que las células que sobreexpresan p19 muestran una importante disminución del número no solo de metafases aberrantes sino también en el número total de figuras cromosómicas aberrantes. Es interesante señalar que las metafases de las células MA-10p19AS con niveles disminuidos de p19 al momento del daño, tuvieron un nivel significativamente mayor en el número de aberraciones espontáneas respecto de la Línea MA-10empty. Estos resultados son consistentes con un modelo en el cuál p19 estaría involucrado en la efectividad de la reparación del daño al ADN y cuya función sería necesaria para alcanzar la máxima eficiencia en el mantenimiento de la integridad del genoma.

Las células de Leydig en el testículo, tienen la función de producir testosterona que resulta esencial en la espermatogénesis (Bartkova et al., 2000). Fue reportado que pacientes tratados con quimioterapéuticos tienen niveles aumentados de ADN

dañado en células espermáticas y que existe una correlación entre el nivel de daño y la secreción disminuida de testosterona en estos individuos (Chatterjee et al., 2000). Por otro lado, fue descripto que ratones *knock-out* para p19 exhiben atrofia testicular muy marcada que se encuentra asociada con el aumento en la apoptosis en la línea germinal (Zindy et al., 2000). Y sumado a esto, ratones doble *knock-out* para p18 y p19 son infértiles debido a una disminuida producción de células espermáticas y a la reducida movilidad y viabilidad de los espermatozoides que llegan a desarrollarse (Zindy et al., 2001). En este sentido, las funciones de p19 en la reparación del ADN y la supervivencia celular podrían ser fisiológicamente relevantes para las células de Leydig en el testículo.

1.4 Independencia de funciones

Finalizando este primer objetivo, nos preguntamos si la función de p19 en la reparación del ADN se encontraba asociada a su actividad como inhibidor del ciclo celular. Para iniciar el estudio en esta dirección medimos reparación del ADN por HCR utilizando en este caso el aminoácido mimosina. Este aminoácido recapituló el arresto del ciclo celular que fue observado por la sobreexpresión de p19 en células MA-10. Entonces propusimos que, si el efecto de p19 sólo estuviera relacionado con la inhibición del ciclo celular, el ensayo de reparación por HCR para mimosina alcanzaría valores similares a los obtenidos para p19. Sin embargo, aunque el tratamiento con mimosina tuvo un aumento en la reparación, este no resultó estadísticamente significativo respecto de las células control.

Por otro lado, introdujimos en el estudio una mutante de CDK4 incapaz de interaccionar con p19. Utilizando nuevamente ensayos de HCR encontramos que CDK4 *wild type* disminuyó los niveles de reparación del ADN observados para la sobreexpresión de p19, mientras que la mutante CDK4R24C no tuvo ningún efecto sobre la respuesta de esta proteína. Concluimos que CDK4 *wild type* estaría “secuestrando p19” impidiendo que esta proteína ejerza su función en la reparación, no ocurriendo lo mismo cuando CDK4R24C es co-expresada con el inhibidor. Estos resultados en conjunto apoyan la hipótesis de independencia de funciones de p19, en donde la función en la reparación no estaría relacionada a su función antiproliferativa.

2. Daño al ADN y fosforilación de p19

2.1 p19 resulta fosforilada en respuesta a daño

La respuesta canónica al daño generado en el ADN fue tradicionalmente dividida en dos vías que involucran cascadas de fosforilaciones. Las quinasas principales de estas vías, ATM y ATR, pertenecen a la familia de proteínas similares a la fosfatidilinositol-3-quinasa (PIKK). Las quinasas ATM y ATR controlan los puntos de control G1/S, intra-S y G2/M a través de la activación de sus efectores río abajo, Chk2 y Chk1 respectivamente. Las quinasas Chk2 y Chk1 finalmente activan proteínas efectoras que propagan la señalización de la respuesta. (Abraham, 2001; Bartek and Lukas, 2003; Harper and Elledge, 2007).

En el segundo objetivo de este trabajo evaluamos la posibilidad de que p19 formara parte de la compleja red de proteínas que resultan fosforiladas en la respuesta al daño. Hemos descrito que la expresión de p19 es inducida en respuesta a radiación UV. Sin embargo, la inducción de p19 no está restringida a este dañador. Ha sido demostrado por nuestro grupo de trabajo que otros agentes genotóxicos también tienen la capacidad de inducir la expresión de p19 (Ceruti et al., 2008). En este último trabajo se evaluaron dos dañadores, cisplatino y péptido β -amiloide, los cuales promueven diferentes tipos de daño. El cisplatino es una potente droga antitumoral que genera principalmente aductos intracatenarios, y el péptido β -amiloide aumenta los niveles de estrés oxidativo intracelular y genera roturas del tipo doble cadena en el ADN (Rabik and Dolan, 2007; Tamagno et al., 2006).

Para estudiar si p19 resulta fosforilada en respuesta a estos daños se realizaron ensayos de marcación metabólica con ^{32}P -ortofosfato en fibroblastos WI-38. Observamos que p19 en condiciones basales no posee niveles detectables de fosforilación, sin embargo, cuando las células son tratadas con alguno de los tres genotóxicos mencionados (luz UV, cisplatino o péptido β -amiloide) p19 efectivamente resulta fosforilada. El mínimo tiempo luego del daño para el cual detectamos fosforilación fue de 20 minutos. Teniendo en cuenta estos resultados y la función en la reparación del ADN de p19 hipotetizamos que la misma podría formar parte del grupo de proteínas *target* de las quinasas que componen las vías ATM/ATR. Resultados aún no publicados, utilizando inhibidores para algunas quinasas de estas cascadas de señales, mostraron que tanto las enzimas apicales ATM y ATR como las quinasas Chk2 y Chk1 estarían involucradas en el proceso de fosforilación de p19 luego de daño, apoyando la hipótesis anterior.

2.2 ¿En qué sitios es fosforilada p19 ?

Para definir los sitios de fosforilación realizamos en primer lugar un análisis *in silico* de la secuencia proteica de p19 buscando los sitios probables de ser modificados a través de la herramienta Netphos. Para los sitios con valores de probabilidad más altos, construimos mutantes reemplazando las serinas o treoninas por alaninas (serinas: 13, 66, 76; treoninas: 89, 141). Estos sitios, además, resultaron conservados en el alineamiento de secuencias de p19 correspondientes a diferentes especies de mamíferos. El estudio de la fosforilación *in vivo* de estas mutantes nos llevó a concluir que los aminoácidos S13, S66 y T89 no son sitios reales de fosforilación por daño, puesto que el estatus de fosforilación en dichas mutantes no fue modificado con respecto al grado de fosforilación observado para p19wt. Sin embargo, sí observamos una disminución en los niveles de fosforilación para la mutante T141 como así también para otra mutante, p19ANKless que carece del último dominio ankirina en el cuál está contenido el sitio T141. Más aún, la mutante en S76 pierde por completo la capacidad de ser fosforilada. Estos resultados postularían a la serina 76 y la treonina 141 como sitios efectivos de fosforilación en respuesta a genotóxicos. Hasta el momento fue reportado un único trabajo en el cuál se describe fosforilación en p19 (Thullberg 2000). Los autores observaron fosforilación en la línea celular U2OS, transfectada con el inhibidor y en condiciones basales. Mediante el análisis de los fosfopéptidos en geles bidimensionales describen dos sitios en donde ocurriría la fosforilación, serina 66 y serina 76 y, además, mencionan una posible fosforilación en alguna treonina. La posibilidad de que la serina 76 y alguna treonina sean fosforiladas concuerda con los resultados hallados en nuestro trabajo. Sin embargo, existen discrepancias en la observación de fosforilación sin la aplicación de tratamiento alguno y en la fosforilación de la serina 66. Esta diferencia podría originarse en los sistemas utilizados para realizar los estudios. Nuestros ensayos de fosforilación fueron conducidos en líneas celulares WI-38 y BHK-21 derivadas de tejidos normales, mientras que la línea celular U2OS fue establecida a partir de tejido tumoral proveniente de osteosarcoma, la cual por su origen podría presentar alterada alguna vía que promoviera la fosforilación. Fue reportado, por sobreexpresión de p19 en células U2OS y SAOS-2 (otra línea derivada de osteosarcoma), que el efecto inhibitorio de p19 a lo largo del ciclo celular es modulado por el mecanismo de degradación ubiquitina-proteasoma (Thullberg et al., 2000). Por otro lado, en un trabajo publicado recientemente observaron que mutantes de p19 imitando una doble fosforilación en los residuos S66 y S76, por reemplazo con ácido glutámico, aumentaban la capacidad de p19 de ser ubiquitinada *in vitro* (Low et al., 2009) La fosforilación de p19 observada *in vivo* en condiciones basales podría promover

entonces, un nivel de degradación más activo de este inhibidor del ciclo celular que permitiera a su vez una tasa de proliferación más elevada en estas líneas tumorales. Esta sería una posible explicación a las diferencias encontradas respecto de nuestros resultados.

El hecho de haber encontrado que la mutante p19T141A disminuye su nivel de fosforilación y que la mutante p19S76A pierde la capacidad de fosforilarse en su totalidad nos llevó a plantear la hipótesis de secuencialidad de la fosforilación. Planteamos que un primer paso de fosforilación en serina 76 podría ser necesario para que una segunda fosforilación ocurriera en la treonina 141.

2.3 ¿Cuáles son las quinasas involucradas en el proceso de fosforilación?

En el análisis *in silico* de las quinasas capaces de fosforilar a p19, CDK5 y PKA fueron señaladas como posibles responsables de la fosforilación en serina 76 y treonina 141, respectivamente. Si bien sólo CDK5 fue señalada en el análisis, CDK1 y CDK2 comparten la misma secuencia consenso de fosforilación (Songyang et al., 1996). Utilizamos inhibidores para estas quinasas en ensayos de fosforilación *in vivo* para evaluar la participación de las mismas en el proceso de fosforilación de p19 endógena, p19wt sobreexpresada y también sobre las mutantes de p19. En el caso de p19 endógena y p19wt, los resultados muestran que ambos inhibidores modificaron los niveles de fosforilación frente al tratamiento con diferentes agentes dañadores (UV, péptido β -amiloide y cisplatino). Roscovitina, potente inhibidor de CDK1, CDK2, CDK5 y CDK7, el cuál afectaría la fosforilación en serina 76 eliminó la fosforilación de p19 en su totalidad, mientras que H-89 inhibidor de PKA, enzima que catalizaría la fosforilación en treonina 141, disminuyó la fosforilación. A partir de estos resultados concluimos, en primer lugar, que PKA y alguna de las CDK que es inhibida por Roscovitina están involucradas, probablemente en forma directa, en el proceso de fosforilación de p19 gatillado en respuesta a genotóxicos. Los resultados obtenidos son congruentes con los encontrados en el análisis de fosforilación de las mutante p19S76A y p19T141A comentados previamente y, consecuentemente, apoyan la hipótesis de secuencialidad.

Por otro lado, utilizando estos mismos inhibidores en el análisis de la fosforilación de las mutantes de p19 encontramos que Roscovitina, como era esperado, elimina la fosforilación observada para p19T141A y p19ANKless. En cuanto al inhibidor de PKA, H-89, observamos que la mutante p19T141A no modifica su nivel de fosforilación por este tratamiento y tampoco lo hace la mutante p19ANKless con ninguno de los

dañadores utilizados. Estos resultados nos llevaron a concluir que las mutantes p19T141A y p19ANKless están siendo fosforiladas por alguna CDK y que, además, en ellas habría sido efectivamente eliminado el sitio de fosforilación en el cuál PKA ejercería su acción. Es decir que la treonina en la posición 141 sería el único sitio de p19 en donde estaría involucrada la fosforilación por PKA.

En eucariotas, la división celular y la respuesta a estrés genotóxico están estrechamente ligadas, por ejemplo, por las vías de los checkpoints que detectan la presencia del daño en el ADN y conducen a un arresto reversible del ciclo celular. Independientemente del mecanismo de reparación del daño que actúe, un paso estrictamente necesario en la respuesta al daño en las células proliferantes es la inhibición del ciclo celular, la cual es mediada por la inhibición de las CDKs, enzimas responsables de conducir la progresión del ciclo (Cerqueira et al., 2009). En células proliferantes, la actividad de las CDKs está modulada por quinasas, fosfatasa e inhibidores que se encuentran directa o indirectamente regulados por las vías de respuesta al daño (Malumbres and Barbacid, 2005). La inhibición en respuesta a daño de la actividad de CDKs que participan en la regulación del ciclo celular, como CDK1 y CDK2, contrasta con los resultados descritos respecto de las quinasas probables de fosforilar a p19 en la serina 76. Sin embargo, trabajos recientes revelan una nueva conexión entre la respuesta al daño y los principales actores de la división celular, en la cual, las CDKs que gobiernan la fase de síntesis de ADN y la mitosis además participan directamente en procesos de reparación del ADN ((Wohlbold and Fisher, 2009). Por ejemplo, en levaduras, CDK1 promueve la reparación de daños doble cadena por el mecanismo de recombinación homóloga y esta actividad es necesaria en múltiples pasos de este mecanismo de reparación (Aylon et al., 2004; Huertas et al., 2008; Ira et al., 2004)). En mamíferos, las funciones precisas de las CDKs en la reparación directa del daño aún no fueron determinadas. Sin embargo, fue reportado que la pérdida de CDK2 resulta en una deficiente reparación del daño doble cadena (Deans et al., 2006; Huertas and Jackson, 2009; Muller-Tidow et al., 2004; Satyanarayana et al., 2008). Entre las proteínas targets de CDKs, integrantes de mecanismos de reparación que han sido descritas hasta el momento, podemos mencionar a 53BP, CtIP, BRCA1, Rad9, Crb2 y ATRIP (Caspari et al., 2002; Myers et al., 2007; Yata and Esashi, 2009). Estos resultados describen a las CDKs como efectores positivos en la respuesta al daño, hasta el momento en la vía de reparación del daño doble cadena, y resultan coherentes con la idea de fosforilación de p19 por CDKs.

La hipótesis acerca de la acción directa de las quinasas fue analizada mediante diferentes estrategias. En primer lugar, buscamos definir en la línea WI-38 cuál de las

CDKs podría estar actuando en la fosforilación. Si bien sólo la quinasa CDK5 fue indicada por la herramienta NetphosK en la fosforilación de p19, CDK1 y CDK2 comparten la misma secuencia consenso de fosforilación (Songyang et al., 1996). Evaluamos fosforilación de p19 utilizando oligonucleótidos antisentido de CDK1 y CDK2 (ASCDK1 y ASCDK2) para disminuir sus respectivas actividades. Como fue mencionado con anterioridad la actividad de CDK5 solo fue reportada en tejido nervioso, por lo cual descartamos su participación en la línea celular WI-38. Los resultados indicaron que CDK2 participaría en el proceso de fosforilación. Sin embargo, no fue detectada ninguna variación en la fosforilación de p19 cuando las células fueron tratadas con el oligonucleótido ASCDK1. Si bien el hecho de no observar variaciones cuando las células son incubadas con ASCDK1 podría implicar que esta quinasa no está relacionada con el proceso de fosforilación, no podemos descartar su participación a partir de estos resultados puesto que no hemos podido detectar una disminución en los niveles de proteína CDK1, observando una baja intensidad de las bandas de la proteína por Western blot. Una explicación posible podría estar fundamentada en que la proteína CDK1 tuviera una vida media larga o también que hubiera fallado el diseño de la sonda antisentido. Sin embargo, obtuvimos una efectiva disminución de los niveles de ARNm para la quinasa CDK1, lo cual indicaría el correcto funcionamiento de la estrategia. CDK2 presenta actividad sobre el final de la fase G1 y en la fase S, mientras que la actividad de CDK1 se desarrolla principalmente en las fase G2 y M (Trimarchi and Lees, 2002). Al conducir los ensayos en células no sincronizadas, el mayor porcentaje de células en estudio se encuentra en las fases G1 y S, para las cuales está descripta la actividad de CDK2. Podemos suponer que CDK1 es una quinasa que efectivamente fosforila p19, que la sonda antisentido para la misma está funcionando correctamente y que el problema en la detección de la proteína estuviera en el anticuerpo y/o las diluciones del mismo utilizadas. En tal caso el bajo porcentaje de células en las fase G2/M y consecuentemente la baja actividad de CDK1 en el total de la población de células analizadas podría explicar la no disminución en el nivel de fosforilación de p19 utilizando la sonda ASCDK1. En este caso la fosforilación por CDK2 enmascararía la disminución de la fosforilación por depleción de CDK1. Entonces, no descartamos la actuación de CDK1 sobre la fosforilación de p19 y concluimos que para analizar este punto el ensayo debería ser realizado en células sincronizadas.

Profundizando en el estudio de las quinasas involucradas en la fosforilación quisimos evaluar si CDK2, CDK5 y PKA serían capaces de fosforilar a p19 en forma directa. En el primer abordaje utilizamos péptidos representando las secuencias de p19 alrededor de los sitios serina 76 y treonina 141 (p-S76 y p-T141 respectivamente). El péptido p-S76 fue incubado con CDK2 o CDK5

inmunoprecipitadas de extractos celulares apropiados dañados por UV, mientras que el péptido p-T141 fue incubado con PKAc purificada de corazón bovino. Concluimos que, tanto CDK2 como CDK5 pueden fosforilar directamente al péptido p-S76 y además que, PKAc tiene la capacidad de fosforilar a p-T141.

Estudiamos luego la capacidad de estas quinasas de fosforilar *in vitro* a la proteína completa p19, empleando las mismas fuentes de las enzimas descriptas para el punto anterior. Observamos fosforilación de GST-p19 para las tres quinasas evaluadas, CDK2, CDK5 y PKAc. Llamativamente, observamos fosforilación por PKAc sobre p19 sin encontrarse fosforilada en serina 76, un posible requerimiento para que esta fosforilación tenga lugar. Sin embargo, el contexto artificial que implica este ensayo *in vitro* muy probablemente actúe forzando esta reacción de fosforilación.

Finalmente, buscamos comprobar la interacción *in vivo* entre las quinasas y p19. En primer lugar, se realizaron estudios de co-inmunoprecipitación, transfectando solamente la proteína p19 en las células. Lamentablemente estos ensayos no fueron exitosos, quizás debido a que las interacciones quinasa-sustrato son muy débiles y de muy corta duración, por lo cual planteamos la necesidad de co-transfectar p19 y las enzimas respectivas. La co-transfección de p19 y PKAc nos permitió detectar la co-inmunoprecipitación de estas dos proteínas. El mismo análisis con las quinasas CDK2 y CDK5 es un objetivo pendiente en este trabajo. En este caso, además de transfectar las quinasas será necesario co-transfectar los coactivadores de cada una de ellas.

2.4 Hipótesis de la fosforilación secuencial

Ahondando en el estudio de la fosforilación secuencial de p19 fue utilizada la técnica de dinámica molecular (MD) para simular este proceso. Los resultados de este análisis mostraron que la fosforilación en serina 76, podría conducir a cambios estructurales en algunas regiones, particularmente los β -hairpins de las repeticiones ankirina 3^o, 4^o y 5^o. El β -hairpin del quinto dominio ankirina contiene a la treonina en la posición 141 por lo cual hipotetizamos que este cambio conformacional podría permitir la interacción entre p19 y una segunda quinasa, probablemente PKA, que actuara sobre el sitio treonina 141. A su vez, los cambios estructurales generados por esta segunda fosforilación podrían favorecer interacciones con otras proteínas ligadas a la función de p19 en la reparación del ADN.

Construimos entonces, una mutante simple y una doble mutante de p19 imitando la fosforilación en serina 76 o en ambos residuos, serina 76 y treonina 141 (p19S76E y p19S76T141E respectivamente). Si la hipótesis de secuencialidad resultara válida, la

mutante que no puede ser fosforilada en serina 76 pero que sí simula esta fosforilación debería permitir la fosforilación de un segundo residuo aminoacídico. Observamos que la mutación por sí misma no es suficiente para promover la fosforilación de p19S76E en condiciones basales, sin embargo, efectivamente comprobamos que p19S76E resulta fosforilada cuando la activación de la respuesta al daño es promovida por luz UV. Sumado a esto, observamos que la mutante p19S76T141E no presenta niveles de fosforilación detectables frente al mismo daño evaluado. Esto hecho sugiere que serina 76 y treonina 141 serían los únicos sitios en p19 en ser fosforilados en respuesta a daño, la fosforilación en serina 76 estaría promoviendo solamente la fosforilación en treonina 141. Por lo cual, de esta parte concluimos que, tanto el resultado del análisis por MD como estas últimas observaciones, apoyan fuertemente la hipótesis de secuencialidad de la fosforilación de p19 en respuesta a agentes genotóxicos, primero en serina 76 y luego en treonina 141.

2.5 ¿En qué compartimiento subcelular ocurre la fosforilación de p19?

La predicción *in silico* de la localización de p19 describe a esta proteína como predominantemente citoplasmática. Sin embargo, fue reportado que p19 se transloca al núcleo luego de irradiación por UV (Ceruti et al., 2005). Modificaciones post-traduccionales como la fosforilación permiten un control temporal y espacial sobre la relocalización de proteínas. Nos preguntamos entonces si la fosforilación, promovida por daño genotóxico, es requerida para el pasaje de p19 desde el citoplasma al núcleo.

Con este objetivo, evaluamos la localización de la proteína por Western blot en relación con los eventos de fosforilación de p19wt o de las mutantes de p19 (p19S76A, p19I41A, p19S76T141A y p19S76E) mediante ensayos de marcación metabólica en los cuales se realizó un fraccionamiento subcelular en forma previa a la inmunoprecipitación de p19wt y sus variantes.

Los resultados obtenidos indican que la fosforilación de p19, luego del daño al ADN, ocurre en el espacio citoplasmático. Los ensayos con la mutante p19T141A y el tratamiento con H-89 en las células con p19wt indican que el sitio serina 76 resulta fosforilado en el citoplasma y que, además, la treonina 141 no es necesaria para el pasaje de p19 al núcleo puesto que, en ambos tratamientos, p19 se observa a los 60 minutos luego de la irradiación con UV en este espacio subcelular. Por otro lado, los ensayos utilizando la mutante p19S76E señalan que la treonina 141, único residuo con

capacidad de ser fosforilado en esta proteína, es también modificado en el citoplasma. Finalmente, la fosforilación de p19 en serina 76 es estrictamente necesaria para la traslocación de la proteína, ya que la mutante p19S76A pierde la capacidad de relocalización nuclear.

2.6 ¿Cuál es la relevancia fisiológica de la fosforilación?

Demostramos que la sobreexpresión de p19wt aumenta significativamente la capacidad de las células MA-10 y WI-38 de reparar el ADN en respuesta a genotóxicos y, además, que p19wt es fosforilada por el tratamiento con estos mismos dañadores. Resultó lógico plantear que la fosforilación de p19 podría estar ligada con su función en la reparación del ADN. Encarando el estudio en esta dirección, realizamos ensayos de UDS para medir reparación del ADN transfectando las mutantes de p19 que disminuyen o pierden por completo la capacidad de ser fosforiladas (p19S76A, p19T141A, p19 ANKless y p19S76T141A). Observamos que las mutaciones en estos sitios afectan sustancialmente los niveles de reparación en contraste con los resultados derivados de la sobreexpresión de p19wt. Los tratamientos correspondientes a las mutantes p19S13A, p19S66A y p19T89A no modificaron la respuesta obtenida para p19wt. Estos resultados avalan la hipótesis planteada inicialmente en la cual la fosforilación de p19 fue postulada como necesaria en la función de p19 de reparación del ADN. Aún más, ambos sitios, serina 76 y treonina 141, son requeridos en esta función. La mutante p19T141A, que conserva cierto nivel de fosforilación por daño, pierde completamente el efecto sobre la reparación. Por otro lado, las mutantes p19S76E y p19S76T141E que imitan la fosforilación, pero perdiendo parcial o completamente la capacidad de ser fosforiladas, recuperan la función de reparación. Hemos señalado previamente, que la serina en la posición 76 es necesaria y suficiente para la translocación de p19 al núcleo en respuesta a daño. El resultado del análisis por UDS demuestra que además treonina 141 es estrictamente necesaria en la función de reparación. La fosforilación en este sitio podría permitir la interacción de p19 en el núcleo con otras proteínas involucradas en la reparación del ADN para cumplir con su función.

Describimos que p19wt capaz de ser fosforilada aumenta sensiblemente la capacidad de las células de reparar el ADN y que este aumento en la reparación está correlacionado con la disminución en la muerte por apoptosis. Planteamos luego que las mutantes de fosforilación perderían el efecto protector de p19 sobre la apoptosis inducida por daño. En efecto, las células transfectadas con las mutantes que pierden la función de reparación del ADN presentan niveles de apoptosis similares a los

observados en las células control, sin sobreexpresión de p19wt. La función de reparación de p19 y en consecuencia, el sitio serina 76 y treonina 141, son fundamentales en la resistencia que ejerce p19 contra la muerte por apoptosis inducida por daño.

El alineamiento de secuencias para las diferentes INK4 reveló que ninguno de los dos aminoácidos, serina 76 o treonina 141 se encuentran conservados en esta familia de inhibidores. La fosforilación en estos sitios podría ser la clave para explicar el comportamiento diferencial de p19 en situaciones de daño al ADN.

Por último, evaluamos la necesidad de la fosforilación en la función clásica de p19 como inhibidor de CDK4/CDK6. En el alineamiento de secuencias para la familia INK4 observamos también que un único sitio potencial de ser fosforilado, treonina 89, se encontraba conservado. Los resultados descritos hasta aquí nos llevaron a plantear que si la función de p19 en la reparación resultara efectivamente independiente de su función inhibitoria del ciclo celular, los sitios serina 76 y treonina 141 responsables de la fosforilación en p19 por daño no estarían involucrados en la inhibición de la proliferación. Además, si bien no obtuvimos fosforilación de p19 en ausencia de daño, pensamos que la treonina conservada en la posición 89 podría tener alguna implicancia, quizás estructural, en la función antiproliferativa de p19. El estudio fue realizado por incorporación de ³H-timidina en la línea WI-38 sobreexpresando todos las mutantes generadas para p19. No encontramos diferencias significativas en las capacidades de arrestar el ciclo celular para ninguna de las mutantes de fosforilación analizadas. La mutante estructural p19ANKless sí modifica parcialmente esta capacidad. En esta mutante la eliminación del quinto dominio ankirina completo podría estar desestabilizando la estructura de p19 en los dominios 1 y 2 que fueron reportados como los responsables de la interacción con CDK4/6 (Low et al., 2009).

Teniendo en cuenta que las mutantes p19S76A, p19T141A y p19S76T141A pierden su función en la reparación pero no en la inhibición del ciclo celular, los resultados expuestos en este punto apoyan fuertemente la hipótesis de independencia de funciones de la proteína p19.

3. Interactores de p19 ligados al rol de reparación del ADN

La pregunta lógica que surge, en base a todos los resultados descritos y discutidos hasta aquí, apunta a descifrar cuál podría ser el modelo de acción de p19 en respuesta al daño al ADN. En este último objetivo iniciamos el estudio en esta dirección a través de la búsqueda de posibles interactores de p19. Utilizamos la técnica de doble híbrido Cytotrap, a partir de la cual, identificamos 6 proteínas de interés. Estas proteínas pueden ser clasificadas en 3 grupos distintos en base a sus funciones descritas hasta el momento: Proteínas de Reparación; Reguladores de Factores de Transcripción ligados al Ciclo Celular y a la Apoptosis; y Factores Remodeladores de la Cromatina. Las 6 proteínas presentan funciones en procesos comunes a p19, razón por la cual resultan de particular interés.

Encontramos una proteína en el primer grupo llamada Cullin-associated and neddylation-dissociated 1 (**CAND1**). Esta proteína tiene, entre otras funciones, un rol fundamental en la regulación del reconocimiento del daño por UV en el ADN y en el reclutamiento de la maquinaria NER. Este rol fue descrito en el año 2006.

En el segundo grupo que comprende Factores de transcripción encontramos a 2 proteínas : Interferon regulatory factor 2 binding protein 2 (**IRF2BP2**) y Cell division cycle and apoptosis regulator 1 (**CCAR1**).

IRF2BP2 fue descrita por primera vez en el año 2003 como una proteína nuclear de unión al dominio represor C-terminal del IRF-2. Inhibe tanto la transcripción basal como la transcripción activada por un estímulo de los genes regulados por este factor. Promueve el arresto del ciclo celular e interfiere con la apoptosis mediada por p53.

CCAR1 fue descrita por primera en el año 2003, como un inductor de apoptosis que regula esta vía de muerte en respuesta a diversos tipos de agentes incluyendo adriamicina. Niveles reducidos de CCAR1 resultan en la inhibición de la apoptosis, mientras que la expresión aumentada provoca niveles elevados de p21 y muerte celular. CCAR1 también interactúa con la proteína 14-3-3 y produce la disminución de la expresión de genes regulatorios del ciclo celular incluyendo c-Myc y ciclina B1.

En el último grupo encontramos 3 proteínas que tienen funciones en la remodelación de la cromatina: *bromodomain containing 7* (**BRD7**); *Geminin*, ADN replication inhibitor (**GMNN**); y *male-specific lethal 1 homolog* (**MSL1**).

La interacción de p19 con factores remodeladores de la cromatina resulta particularmente atractiva porque la función de p19 en la reparación del ADN no parece

estar dirigida a un mecanismo de reparación en particular. Hemos descrito que la inducción y fosforilación de p19 se produce en respuesta a distintos agentes genotóxicos y cuyos daños resultan reparados por mecanismos diferentes. La eficiencia de reparación de estos daños se ve influenciada por los niveles proteicos de p19 y también por su fosforilación. La participación de p19 en mecanismos diversos podría ser explicada por una función en la respuesta primaria al daño común para los genotóxicos ensayados. Esta función podría ser la de actuar en la remodelación de la cromatina, razón por la cual p19 sería propuesto como un factor ligado a la accesibilidad de la cromatina.

BRD7 fue identificada por primera vez como una proteína de unión al Factor Regulador del Interferon 2 (IRF-2) en 1997. Es predominantemente nuclear observando una co-localización con histonas H3 y H4 hiperacetiladas. La sobreexpresión de BRD7 inhibe el crecimiento y la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la fase S. Recientemente BRD7 fue descrito como un componente del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF (2008).

MSL1 es una proteína descrita recientemente en humanos (2005) que codifica una de las cinco proteínas que forman un complejo altamente conservado denominado MSL (*male-specific lethal*) con actividad de histona acetil-transferasa (HAT). La proteína MOF, que forma parte del complejo está involucrada en la activación de ATM en respuesta a daño al ADN. La acetilación de p53 por MOF influencia la decisión celular de inducir apoptosis por sobre el arresto del ciclo celular. Fue propuesto que la proteína 53BP1 reclutaría a MSL1 a los alrededores del ADN dañado y que luego el complejo MSL aumentaría la acetilación en lisinas 16 en histonas H4. La modificación de histonas conduciría a cambios estructurales induciendo la remodelación de la cromatina y la relajación del ADN permitiendo a la maquinaria de reparación acceder a los sitios dañados (2009).

GMNN fue caracterizada como una molécula de función dual con roles en el mantenimiento de la integridad del genoma a través de la regulación del licenciamiento de la replicación del ADN. Fue descrita la interacción entre GMNN y Brg1, la subunidad catalítica del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF, que antagoniza la transcripción dependiente de Brg1 y regula la transición entre proliferación y diferenciación durante la neurogénesis (2005). También interacciona e inhibe Cdt1, el cual es proteolizado en la fase G1 en respuesta a daño en el ADN, presumiblemente conformando un nuevo checkpoint.

Es interesante destacar que las proteínas descritas ó bien las funciones que hacen más llamativa la posibilidad de interacción de ellas con p19, han sido descritas en los últimos 6 años. Esto podría implicar que aún existe un amplio campo de estudio

en los mecanismos en los cuales están involucradas y de los cuales p19 podría formar parte.

La confirmación de las interacciones *in vivo* entre p19 y estos candidatos es un objetivo que será continuado por el laboratorio. Aspiramos a describir un mecanismo de acción que integre la inducción de la expresión de p19, su fosforilación y la participación de esta proteína en la respuesta al estrés genotóxico, la cual resulta crítica en el mantenimiento normal de la estabilidad del genoma y consecuentemente en la supervivencia celular.

**MATERIALES
Y METODOS**

Cultivo de Líneas Celulares

Medios de cultivo. Las células de Leydig MA-10 fueron cultivadas en botellas T25 y T75 (TRP) y mantenidas en medio Waymouth MB752/1 conteniendo 1,1 mg/ml de NaHCO_3 , 20 mM HEPES, 50 μg gentamicina y 15% de suero de caballo, a 37 °C en atmósfera humidificada con 5% de CO_2 . La línea celular fibroblástica humana WI-38 fue cultivada en placas de 100 mm de diámetro y en botellas T75 (TRP) y mantenida en medio esencial mínimo (MEM) conteniendo 10% de suero fetal bovino (SFB), L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, bicarbonato de sodio 1,5 g/l, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 μg /ml, Anfotericina B 1 mg/ml a 37 °C y en atmósfera de aire con 5% de CO_2 . La línea celular fibroblástica BHK-21 proveniente de riñón de hámster (*Mesocricetus auratus*) fue cultivada en placas de 100 mm y mantenidas en medio D-MEM (*Dulbecco's modified Eagle medium*, GIBCO) suplementado con 10% de SFB, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, bicarbonato de sodio 1,5 g/l, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 μg /ml, Anfotericina B 1mg/ml a 37 °C y en atmósfera de aire con 5% de CO_2 .

Tripsinización. Una vez que las células formaron una monocapa, el medio de cultivo fue aspirado y descartado, las células se lavaron una vez con PBS para remover los inhibidores de tripsina presentes en el suero y luego se agregó a cada placa o botella 1,5 ml de solución de tripsina 0,25%, EDTA 0,53 mM (GIBCO). Se incubaron a 37 °C hasta observar en el microscopio que las células se despegaron. Luego fueron resuspendidas en medio fresco, se determinó el número y la viabilidad celular como se indica más abajo y se sembraron a una densidad de $2,0 \times 10^4$ células/ cm^2 en botellas T25 o T75 o en placas de 100 mm de diámetro.

PBS: 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na_2HPO_4 , y 0,24 g de KH_2PO_4 en 1 litro de agua bidestilada, pH 7,4.

Determinación del número de células y su viabilidad. Para la determinación del número de células y su viabilidad se empleó el método de exclusión del azul tripán. Se colocaron 50 μl de la suspensión celular en 30 μl de medio y 20 μl de la solución de azul tripán 4% (azul tripán 400 mg, NaCl 810 mg, K_2HPO_4 60 mg y metil-p-hidroxibenzoato 50 mg a pH 7,4, en PBS). Se colocó una gota de esta mezcla en una cámara de Neubauer y se efectuó el recuento celular (N) al microscopio óptico en los cuatro cuadrantes de la cámara entre los 5 y los 10 minutos luego del agregado del colorante. El número de células totales por ml y el porcentaje de viabilidad se calculó aplicando las siguientes fórmulas:

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

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

Arresto del ciclo celular.

Las células creciendo exponencialmente fueron arrestadas en la fase G1 temprana mediante la incubación en medio con 1% de suero durante 36 horas y fueron inducidas a retomar el ciclo celular en forma sincrónica mediante el agregado de 10% ó 15% de suero al medio de cultivo dependiendo del cultivo celular.

Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo.

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

Análisis de ARN por Northern blot.

Obtención de RNA total. El ARN total fue obtenido según el método descrito previamente (Chomczynski and Sacchi, 1987), levemente modificado. Partiendo de 2×10^6 células en placas de 6 cm de diámetro, se lavaron una vez con PBS frío, se agregaron 700 μl de solución D desnaturizante, se homogeneizaron con micropipeta y se trasvasaron a un tubo eppendorf. Todo el trabajo se realizó sobre hielo. Se agregaron luego 50 μl de acetato de sodio 2 M pH 4,5, 400 μl de fenol saturado en Tris pH 8,0 y 90 μl de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1). La suspensión fue agitada vigorosamente durante 10 segundos con un vórtex y centrifugada durante 20 minutos a 10.000 rpm a 4 °C. La fase superior acuosa, que contiene el RNA se trasvasó a otro tubo y el mismo fue precipitado agregando un volumen de isopropanol y dejándolo durante 1 hora a -20 °C. Se centrifugó luego a 10.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 150 μl de solución D.

El ARN fue reprecipitado con 150 μ l de isopropanol centrifugándolo 20 minutos a 10.000 rpm. Se lavó 2 veces con etanol 75% y se resuspendió en 22 μ l de agua estéril libre de RNasas.

La concentración del ARN se calculó midiendo la absorbancia a 260 nm ($1 \text{ OD}_{260} = 40 \mu\text{g}$ de RNA) aceptando como criterio de pureza un cociente A_{260}/A_{280} mayor que 1,7 (Sambrook et al, 1989).

Solución D desnaturalizante: isotiocianato de guanidina 4M, citrato de sodio 25 mM pH 7, N-laurilsarcosina 5 %, β -mercaptoetanol 0,1 M.

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

Buffer de Siembra: glicerol 50%, fosfato de sodio 10 mM pH 7, azul de bromofenol 0,25% y xilene cianol FF 0,25%.

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

SSC 20X: NaCl 3 M, citrato de sodio 0,3 M pH 7

Marcación de sondas

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

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

Buffer TE: 10 mM Tris-HCl pH 8 y EDTA 1 mM.

β -tubulina. Los resultados de los ensayos de Northern blot fueron normalizados con los valores de los niveles de ARNm de β -tubulina detectados en paralelo. Se eligió el gen de la β -tubulina por ser un gen de expresión constitutiva, no afectado por las fases del ciclo celular. Para detectar el ARNm de β -tubulina se empleó como molde el ADNc de β -tubulina de pollo escindido del plásmido pBR322 β -tubulina (cedido por el Dr. J. Messina; Universidad de South Florida, Florida, EEUU) por digestión con la enzima Hind III. El cADN se marcó radiactivamente por la técnica de hibridización con hexaoligonucleótidos de secuencia al azar ("*random primers*"). Se mezclaron 40 ng del ADN molde, previamente desnaturalizado 5 minutos a 95 °C, buffer de reacción correspondiente, 2 U del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de E.coli, 0,25 DO de la mezcla de hexaoligonucleótidos de secuencia al azar, dATP, dTTP, dGTP a una concentración 500 μ M cada uno y [α -³²P]dCTP 10 μ Ci/ μ l, (3.000 Ci/mmol). La mezcla de reacción fue incubada a 25 °C deteniéndose luego de 1 hora con "stop buffer" (Tris 50 mM pH 8, EDTA 5 mM, NaCl 50 mM y SDS 0,5%). La sonda fue precipitada con 1/10 del volumen de acetato de amonio 7,5 M pH 5,5 y 2 volúmenes de etanol absoluto durante 1 hora a -20 °C. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 minutos, se lavó el precipitado con etanol 70% y se resuspendió en 100 μ l de buffer TE (Tris 10 mM y EDTA 1 mM). Una alícuota de la sonda se colocó en un vial con líquido centellante a base de tolueno y se contó la radioactividad en un contador de centelleo líquido. Las sondas así obtenidas poseían una actividad específica aproximada de 5-7 x 10³ cpm/fmol.

Para detectar el ARNm de p16INK4a, p15INK4b, p18INK4c, se utilizaron como sondas, los ADNc correspondientes marcados con [α - 32 P]dCTP con el método de “*random primers*” de manera similar a la descrita para β -tubulina.

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

Para detectar los ARNm de β -tubulina, p16INK4a, p15INK4b, p18INK4c, la prehibridización se llevó a cabo en una solución bloqueante (SSC 6X, SDS 1%, Denhardt 2X, y ADN de esperma de salmón 100 μ g/ml) durante 2 horas a 68 °C en horno de hibridización con rotación. Posteriormente se agregaron las sondas correspondientes y se completó la hibridización a 68 °C por 16 horas más. Finalizado este procedimiento, las membranas fueron sometidas a dos lavados a temperatura ambiente con SSC 2X y SDS 0,1% durante 15 minutos y dos lavados a 68 °C con SSC 0,2X y SDS 0,1% durante 15 minutos.

Autorradiografía y cuantificación. Las membranas lavadas se secaron entre papel Whatmman 3MM por 30 minutos, se envolvieron con nylon impermeable y se expusieron en un *casette* con pantalla radiográfica intensificadora (FUJIFILM) a temperatura ambiente entre 24 y 72 horas. Luego de escanear las pantallas en un analizador de imágenes Bio-Imaging Analyzer Fujifilm BAS-1800II, las imágenes resultantes se cuantificaron con el programa ImageQuant, Amersham Biosciences.

Análisis de proteínas por Western blot

Preparación del lisado celular total. Aproximadamente $2,0 \times 10^6$ células cultivadas en placas de 60 mm, se lavaron dos veces con PBS frío, se pasaron a un eppendorf con 1 ml de PBS, se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos para precipitar las células y se descartó el sobrenadante. El lisado celular total fue preparado con 60 μ l de buffer RIPA conteniendo inhibidores de proteasas frescos (PMSF 100 μ g/ml, aprotinina 60 μ g/ml y ortovanadato de sodio 1 mM). Luego de

homogeneizar las células, se dejaron en hielo durante 30 minutos. Se centrifugaron a 10.000 rpm por 10 minutos para remover los restos celulares y se guardó una alícuota del sobrenadante para cuantificar proteínas por el método de Bradford.

Buffer RIPA: Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1%, deoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%.

Electroforesis en gel de poliacrilamida. En todos los casos las muestras fueron analizadas en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1970). Utilizamos el sistema vertical de Bio-Rad. El gel separador (inferior) se preparó al 12% (1,5 ml de agua destilada estéril, 1,6 ml de solución de acrilamida/ bisacrilamida al 30%, 0,8 ml de Tris 1,5 M pH 8,8, 40 μ l de SDS 10%, 40 μ l de persulfato de amonio 10% y 2,5 μ l de TEMED) en algunos casos el porcentaje de poliacrilamida utilizado fue del 15%, y el gel concentrador (superior) se preparó al 5% (2,04 ml de agua destilada estéril, 0,51 ml de solución de acrilamida/ bisacrilamida al 30%, 0,37 ml de Tris 1 M pH 6,8, 30 μ l de SDS 10%, 30 μ l de persulfato de amonio 10% y 3 μ l de TEMED). Las muestras, con el buffer de siembra se hirvieron durante 3 minutos. En un pocillo se sembraron 5 μ l del marcador de peso molecular (*Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker*, Amersham Life Science). Luego se realizó la electroforesis, a 100 V, en buffer Tris-Glicina-SDS 1X hasta que el azul de bromofenol alcanzó el final del gel separador.

Transferencia a membrana. Una vez concluida la separación electroforética, las proteínas fueron transferidas a un soporte sólido, en este caso un filtro de nitrocelulosa (Burnette, 1981). Una de las caras del gel fue apoyada sobre un trozo de nitrocelulosa del mismo tamaño y ambos fueron colocados entre papeles Whatman 3MM previamente humedecidos en buffer de transferencia 1X y estos a su vez colocados entre dos esponjas de poro grande y dentro de un soporte plástico. Toda la construcción fue sumergida en el tanque electroforético, con buffer de transferencia 1X, con el filtro de nitrocelulosa del lado anódico. La transferencia se llevó a cabo a 200 mA, durante 60 minutos.

Buffer Tris-Glicina-SDS 1X: Tris base 25 mM, glicina 250 mM pH 8,3, SDS 0,1%.

Buffer de Transferencia 1X: Tris-glicina 1X, SDS 0,01%, metanol 20%.

Buffer de Siembra: Tris-HCl 50mM pH 6,8, β -mercaptoetanol 100 mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%.

Detección de proteínas. Luego de la transferencia, se colocó la membrana de nitrocelulosa en una solución de bloqueo (leche descremada en polvo 5% en TBS 1X) y se dejó en agitación O.N. a 4 °C para reducir los sitios potenciales de unión de proteínas irrelevantes. Luego se incubó la membrana con el anticuerpo primario diluido en TBS 1X durante 3 horas a temperatura ambiente con agitación suave. La membrana se lavó 3 veces con Tween 20 0,05% en TBS 1X, durante 5 minutos. Luego se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con la enzima peroxidasa de rabanito (HRP) diluido en solución de bloqueo durante 90 minutos a temperatura ambiente. La membrana se lavó 3 veces nuevamente con Tween 20 0,05% en TBS 1X, durante 5 minutos y una vez con TBS 1X, también durante 5 minutos. Para visualizar las proteínas de interés se utilizó el kit de detección ECL (Amersham Pharmacia Biotech), basado en la producción de quimioluminiscencia como consecuencia de la digestión de un sustrato de la enzima HRP. La señal fue detectada en un analizador de imágenes Bio-Imaging Analyser Fujifilm LAS-1000. Como control de carga del gel se utilizó la técnica de tinción de un gel de proteínas corrido en paralelo con el colorante Coomassie Blue.

Anticuerpos primarios:

- Anticuerpo anti-p19INK4d humana de ratón, P1000-38, USBiological.
- Anticuerpo anti-V5, monoclonal de ratón. R960-25, Invitrogen.
- Anticuerpo anti-PKAc humana, policlonal de conejo. C-20, Santa Cruz Biotechnology.
- Anticuerpo anti-GAPDH, monoclonal de ratón. AB8245 clon 6c5, ABCAM.
- Anticuerpo anti-histona H3, policlonal de conejo. C-16 sc-8654-R, Santa Cruz Biotechnology.

Anticuerpos secundarios:

- Goat anti-mouse conjugado con HRP, sc-2005 (Santa Cruz).
- Goat anti-rabbit conjugado con HRP, sc-2004 (Santa Cruz).

Agentes genotóxicos

Irradiación ultravioleta. Células en crecimiento exponencial fueron tripsinizadas y sembradas a 60% de confluencia. Veinticuatro horas más tarde, se removió el medio y las células fueron irradiadas en placas abiertas a diferentes energías de luz UVC, de 254 nm (rango 240-280) según lo indicado, con una lámpara Philips TUV15WG15T8 calibrada para otorgar 0,25 mJ/cm².seg. Luego de la

exposición, el medio fue readicionado y las células incubadas en estufa a 37 °C con 5% CO₂ durante los tiempos indicados en cada caso.

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

Inhibidores de quinasas

La incubación de las células con los diferentes inhibidores fue iniciada una hora antes de la aplicación del daño. Los inhibidores utilizados fueron los siguientes: inhibidor de PKA: H-89 (1 μM final) e inhibidor de CDKs: roscovitina (10 μM final). Las células fueron tratadas o no con los distintos agentes genotóxicos como se indicó anteriormente, pero en este caso el medio que contenía a los inhibidores no fue reemplazado. Posteriormente las células fueron incubadas en estufa a 37 °C con 5% CO₂ durante los tiempos indicados en cada ensayo.

Preparación de plásmidos

Obtención de bacterias competentes. Las bacterias competentes se prepararon según una variante del método de Cohen (Cohen et al., 1972), descrita por Sambrook y Russell (Sambrook et al., 2001). Brevemente, se inocularon 2 ml de medio LB líquido (extracto de levadura 5 g, peptona 10 g, NaCl 5 g, agua c.s.p 1 litro) con bacterias *Escherichia coli*, cepa DH5α e incubaron con agitación constante a 37 °C, durante toda la noche. Luego se diluyó el cultivo a 50 ml con medio LB y se incubó a 37 °C con agitación, hasta que alcanzó la fase exponencial de crecimiento (DO₆₀₀= 0,35-0,4). Se enfrió el cultivo en hielo y se centrifugó a 5.000 x g durante 5 minutos. El pellet de bacterias fue resuspendido en 10 ml de CaCl₂ 60 mM frío y se mantuvo en hielo durante 30 minutos. Se centrifugó a 5.000 x g y el pellet celular se resuspendió en una solución de CaCl₂ 60 mM, glicerol 15%. Las bacterias competentes se alicuotaron y almacenaron a -70 °C.

Transformación de bacterias competentes. Una pequeña cantidad de ADN plasmídico (50-100 ng) se incubó con 50-100 μ l de bacterias en hielo durante 45 minutos. A continuación las bacterias fueron sometidas a un *shock* térmico a 42 °C durante 60 segundos, seguido de un enfriamiento rápido en baño de agua con hielo. Luego se agregó LB hasta completar un volumen de 1 ml y se incubó durante 45 minutos a 37 °C. Las bacterias se centrifugaron y se resuspendieron en 50 μ l de sobrenadante. Se sembraron en placas de Petri con LB agar 1,5% con ampicilina (100 μ g/ml). Se incubaron 16 horas en estufa a 37 °C.

Preparación de plásmidos en baja escala (*miniprep*). Los plásmidos fueron preparados utilizando el kit de minipreparación plasmídica Wizard Plus (Promega). Las bacterias transformadas con el plásmido a aislar fueron inoculadas en 3 ml de medio LB con ampicilina (100 μ g/ml) e incubadas durante 16 horas. Una vez obtenido el pellet bacteriano, se prosiguió con la extracción plasmídica según las instrucciones del fabricante.

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

Análisis de las preparaciones plasmídicas.

Con el objeto de determinar la concentración y calidad de las preparaciones las mismas fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa 0,8-1% en buffer TAE conteniendo 0,5 μ g/ml de bromuro de etidio. Las muestras fueron sembradas con buffer de siembra 6X (azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30%), sometidas a electroforesis a voltaje constante (5 V/cm) y visualizadas por transiluminación con luz UV. Paralelamente, las preparaciones plasmídicas fueron cuantificadas espectrofotométricamente:

$DO_{260} = 1$ equivale 50 μ g/ml de ADN.

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

Buffer TAE: Tris-acético 0,4 M, EDTA 1 mM.

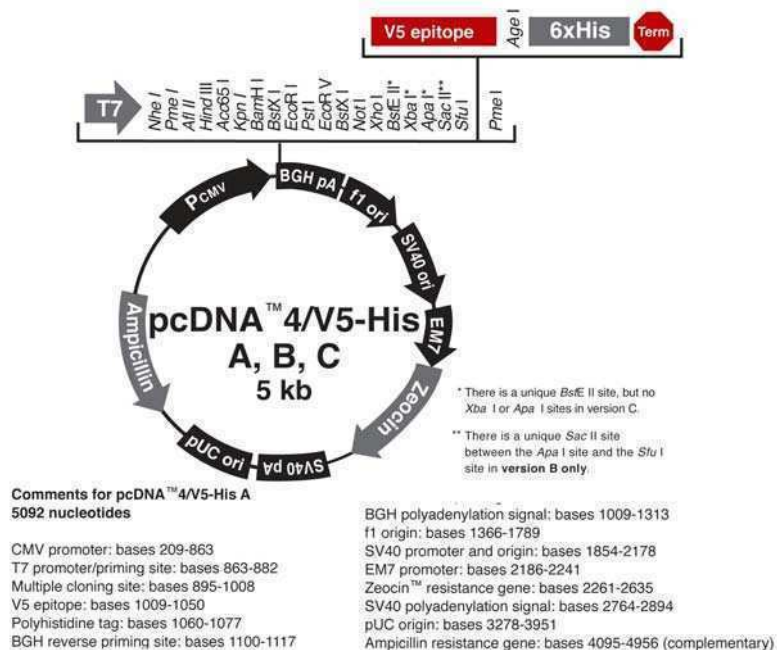
Subclonados y Mutagénesis Dirigida

Subclonado del cADN de p19INK4d

La secuencia codificante completa de p19 humana fue amplificada por PCR a partir del ADNc copia previamente clonado desde una biblioteca de cADN de cerebro humana. Este fragmento fue clonado en el vector de expresión **pcADN4/ V5-His C** (Invitrogen) utilizando los siguientes oligonucleótidos (primers) diseñados con sitios de corte para las enzimas BamHI y EcoRI respectivamente:

primer forward: 5´ CGGGATCCCGATGCTGCTGGAGGAGGTTTCGC 3´

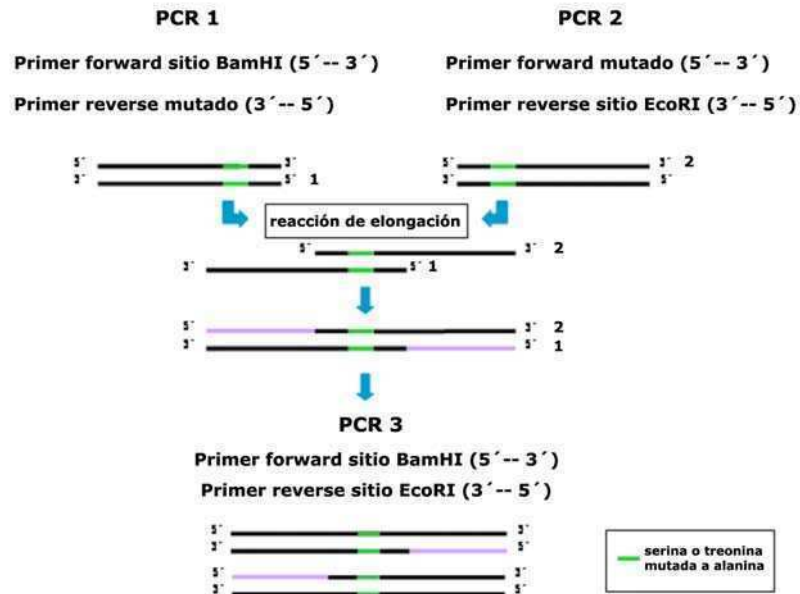
primer reverse: 5´ GGAATTCCTCCAGCGGGGCCACCATGTG 3´



Construcción de mutantes p19S66A, P19S76A, p19T141A, p19S76E

En la generación de las mutantes de p19 que se describen a continuación se utilizó la estrategia "Mismatched Primer Mutagénesis", la cual pertenece a las estrategias basadas en PCR de mutagénesis dirigida *in vitro*. (Higuchi R (1990) Recombinant PCR. In: *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications* (MA Innis, DH Gelfand, JJ Sninsky, TJ White, eds), pp. 177–183. Academic Press, San Diego, CA.). Brevemente, esta estrategia utiliza un primer que es parcialmente complementario al sitio *target* pero de unión específica. Dos reacciones de

mutagénesis son diseñadas en las cuales los dos productos de PCR generados presentan una pequeña región conteniendo la mutación que se solapa. Estos dos productos son combinados en una tercera reacción de PCR para generar el producto completo con la mutación en una localización más central (Figura).



Primers utilizados en los clonados de las mutantes p19S66A, p19S76A y p19T141A:

p19S66A, reemplazo de serina 66 (AGC) por alanina (GCC):

primer reverse (1): 5' GTCCTGGACATTGGG GGC GGCACCTTGCTCAG 3'

primer forward (2): 5' CTGAAGCAAGGTGCC GCC CCCAATGTCCAGGAC 3'

p19S76A, reemplazo de serina 76 (AGT) por alanina (GCT):

Primer reverse (1): 5' CTGCGTCATGGACTGG AGC GGTACCCGGAGG 3'

primer forward (2): 5' GACACCTCCGGTACC GCT CCAGTCCATGACGCAG 3'

p19T89A, reemplazo de treonina 89 (ACC) por alanina (GCC):

Primer reverse (1): 5' CACTAGGACCTTCAG GGC GTCCAGGAATCCAGT 3'

primer forward (2): 5' ACTGGATTCCTGGAC GCC CTGAAGGCCTAGTG 3'

p19S76E, reemplazo de serina 76 (AGT) por ácido glutámico (GAA):

Primer reverse (1): 5´ CTGCGTCATGGACTGG **TTC** GGTACCGGAGGTGTC 3´
 primer forward (2): 5´ GACACCTCCGGTACC **GAA** CCAGTCCATGACGCAG 3´

En todos los casos los primers conteniendo los sitios de restricción fueron los siguientes:

primer forward (BamHI): 5´ **CGGGATCC**CGATGCTGCTGGAGGAGGTTTCGC 3´
 primer reverse (EcoRI): 5´ **GGAATTC**CTCCAGCGGGGCCACCATGTG 3´

Construcción de mutantes p19ANKless, p19S13A, p19T141A, p19S76T141A, p19S76T141E

Las siguientes mutantes se subclonaron en el vector **pcADN4/ V5-His C** en los sitios de restricción BamHI – EcoRI utilizando los siguientes primers:

p19ANKless, delección del último dominio ankirina, aminoácidos 138-166

primer forward (BamHI): 5´ **CGGGATCC**CGATGCTGCTGGAGGAGGTTTCGC 3´
 primer reverse (EcoRI): 5´ **GGAATTC**CCCTGGCGTCCCTGCGATGGAGA 3´

p19S13A, reemplazo de serina 13 (AGT) por alanina (GCC)

primer forward (BAMHI): 5´ **CGGGATCC**CGATGCTGCTGGAGGAGGTTTCGCG
 CCGGCGACCCGGCTG GCC GGGGCG 3´
 primer reverse (EcoRI): 5´ **GGAATTC**CTCCAGCGGGGCCACCATGTG 3´

p19T141A, reemplazo de treonina 141 (ACA) por alanina (GCC)

primer forward (BamHI): 5´ **CGGGATCC**CGATGCTGCTGGAGGAGGTTTCGC 3´
 primer reverse (EcoRI): 5´ **GGAATTC**CTCCAGCGGGGCCACCATGTGGCCC
 TGCAGGATGTCCACGAGGTCCTGAGCCCCTCTCT
 GCA GTGCCAGCTCCAAGGG GGC GAGACC 3´

p19S76T141A, reemplazo de serina 76 (AGT) y treonina 141 (ACA) por alanina (GCT - GCC)

Como templado de esta reacción de PCR se empleó la mutante p19S76A descrita anteriormente.

primer forward (BamHI): 5' CGGGATCCCGATGCTGCTGGAGGAGGTTTCGC 3'

primer reverse (EcoRI): 5' GGAATTCCTCCCAGCGGGGCCACCATGTGGCCCT
GCAGGATGTCCACGAGGTCCTGAGCCCCTCTCTGCA
GTGCCAGCTCCAAGGG GGC GAGACC 3'

p19S76T141E, reemplazo de serina 76 (AGT) y treonina 141 (ACA) por ácido glutámico (GAA)

Como templado de esta reacción de PCR se empleó la mutante p19S76E descrita anteriormente.

primer forward (BamHI): 5' CGGGATCCCGATGCTGCTGGAGGAGGTTTCGC 3'

primer reverse (EcoRI): 5' GGAATTCCTCCCAGCGGGGCCACCATGTGGCCC
TGCAGGATGTCCACGAGGTCCTGAGCCCCTCTCTGC
AGTGCC AGCTCCAAGGGTTCGAGACC 3'

La fidelidad de todos plásmidos generados fue analizada por secuenciación del ADN.

Transfección transitoria de células y selección.

Las transfecciones en células MA-10 se llevaron a cabo de acuerdo con el protocolo *standard* de precipitación por fosfato de calcio (Chen and Okayama, 1988). En general, las células fueron plaqueadas en placas de 35 mm a una densidad de 5×10^6 células/placa en 2,5 ml de medio. Luego de 24 horas, cada pocillo fue transfectado con una mezcla conteniendo 4 μg de pCMVCAT y 6,5 μg de pCMV β gal junto con los plásmidos indicados en cada experimento. Por cada pocillo a transfectar se preparó un tubo conteniendo 150 μl de HeBS 2X y 3 μl de Buffer Fosfato. Por otro lado, se prepararon las distintas soluciones de plásmidos en 20 μl de CaCl_2 2 M y H_2O c.s.p. 147 μl . Cuando se indica, 4 μg de vector de expresión para CDK4wt o CDK4R24C fueron empleados. La cantidad final de ADN fue ajustada en todos los casos a 20 μg por pocillo, la que fue completada con cantidad necesaria de ADN "carrier" (ADN genómico de esperma de salmón). Las distintas preparaciones plasmídicas se

agregaron lentamente a la solución de fosfato de sodio, mientras ésta se agitaba en forma continua con vórtex. Se dejó reposar 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación del precipitado y se agregaron a cada pocillo 250 μ l de la correspondiente preparación de ADN. Se dejó recuperar a las células en medio completo aproximadamente por 20 horas. Al cabo de este período, las células fueron lavadas con PBS y cultivadas con 2,5 ml de medio completo por los tiempos indicados. Luego se realizaron las distintas determinaciones.

Las células WI-38 y BHK-21 fueron transfectadas utilizando el reactivo Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. En general, 1×10^6 células sembradas en pocillos de 35 mm fueron con 2,5 μ g de plásmido total. En los ensayos de UDS, ciclo celular y caspasa-3, 2 μ g de pcADN4cp19 o de las mutantes de p19 fueron transfectados junto con 0,5 μ g de plásmido pBABE que confiere resistencia al antibiótico puromicina. Veinticuatro horas luego de la transfección se agregó al medio el antibiótico puromicina (Sigma) 2,5 μ g/ml y luego de 60 horas de selección, las células resistentes (transfectadas) fueron utilizadas en los distintos ensayos.

En los ensayos de fosforilación *in vivo*, las células fueron plaqueadas a 60% de confluencia en placas de 60 mm. Luego de 24 horas, las células fueron transfectadas con 5 μ g de plásmido total y, 24 horas más tarde, fueron utilizadas en los diferentes ensayos.

En los ensayos de fosforilación *in vivo*, en dónde se realizó fraccionamiento subcelular, las células fueron plaqueadas en cajas de 100 mm, transfectadas con 14 μ g de plásmido total y, 24 horas más tarde, fueron utilizadas en los diferentes ensayos.

HeBS 2X: HEPES 1% pH 7, NaCl 1,6%.

Buffer Fosfato: NaHPO₄ 0,06 M, NaH₂PO₄ 0,07 M.

Actividad de la enzima caspasa-3

Para determinar el nivel de apoptosis en las células luego del tratamiento con daño se midió la actividad de la enzima caspasa-3. El ensayo fue realizado como fue descrito previamente, con algunas modificaciones (Chen et al., 2005). Las células fueron cultivadas en pocillos de 35 mm a razón de 1×10^6 células/pocillo y fueron tratadas con distintos agentes genotóxicos por 24 h. Luego, fueron cosechadas y lavadas 1 vez con PBS y resuspendidas en 325 μ l de buffer de lisis en los tiempos indicados, incubadas 30 minutos a 37 °C y centrifugadas a 12.000 rpm por 20 minutos. La actividad de caspasa-3 fue determinada con 150 μ l del lisado celular

utilizando 100 μM del sustrato sintético Ac-DEVD-pNA (Sigma) en buffer de reacción en un volumen final de 300 μl incubando la mezcla a 37 °C por 4 horas. La aparición de color amarillo, indicativo de la actividad de caspasa-3 fue cuantificada en espectrofotómetro a 405 nm. La actividad de caspasa-3 fue estimada como $A_{405\text{nm}}/\mu\text{g}$ proteína x hora.

Buffer de Lisis: 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA, 10 mM EGTA, 10 μM digitonina, 500 μM PMSF, 10 $\mu\text{g/ml}$ bisbenzamida, 10 $\mu\text{g/ml}$ pepstatina, y 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinina.

Buffer de Reacción: 100 mM HEPES pH 7,5, 0.5 mM EDTA, 5 mM ditioneol y 20% v/v glicerol.

Generación de líneas celulares estables para p19INK4d

Las transfecciones se llevaron a cabo con el reactivo Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante y como está descrito en el punto 12. Células de Leydig MA-10, plaqueadas en pocillos de 35 mm para llegar a 90% de confluencia en el momento de la transfección, fueron transfectadas con 3 μg de plásmido de expresión pMTCB (vacío), ó pMTCBp19 ó pMTCBp19AS que expresan la proteína p19INK4d salvaje y la secuencia antisentido respectivamente, río abajo del promotor del gen de la metalotioneína, inducible con Zn^{2+} . Además, el vector pMTCB confiere a las células resistencia al antibiótico geneticina (G418). Cuarenta y ocho horas luego de la transfección, las células fueron tripsinizadas, diluidas y sembradas en placas de 60 mm con medio fresco conteniendo 300 $\mu\text{g/ml}$ de geneticina (Sigma). La presión de selección se mantuvo durante 2 semanas cambiando el medio cada 4 días. Los clones de células resistentes fueron aislados y crecidos hasta tener una cantidad de células suficiente para analizar la expresión (incremento o inhibición, según el caso) del gen de p19 mediante Northern blot, en ausencia o en presencia de Zn^{2+} .

Síntesis de ADN no programada (UDS, *Unscheduled ADN Synthesis*).

Las células, transfectadas en pocillos de 35 mm con los vectores indicados, fueron lavadas dos veces con PBS y el medio fue reemplazado por medio con 1% suero y libre de arginina (*medio UDS*). Luego de 24 horas el medio fue reemplazado por *medio UDS* fresco por otras 36 h. Bajo estas condiciones, determinamos que la síntesis de ADN semiconservativa es inhibida completamente. Las células fueron

lavadas con PBS, dañadas o no e incubadas nuevamente con *medio UDS* fresco y 10 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -timidina. En los tiempos indicados, se determinó la incorporación de ^3H -timidina. Las células fueron lavadas 3 veces con PBS frío, cosechadas y centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos. Luego fueron lisadas con 500 μl de 5% TCA por 30 minutos y centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. El pellet fue lavado dos veces con agua fría y resuspendido en 50 μl de 1 M NaOH. La radioactividad incorporada fue cuantificada en un contador de centelleo. La reparación del ADN fue estimada como dpm/ μg de proteína.

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

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

Irradiación de plásmido. A efectos de evaluar la capacidad de reparación de las células de Leydig MA-10 en condiciones basales, se realizó un experimento de transfección de plásmidos irradiados con UV, en un rango de energía entre 0 y 640 mJ/cm^2 . Se colocó el plásmido a irradiar en placas de Petri de 6 cm sobre hielo, a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$.

Transfección de células. El protocolo de transfección utilizado el método de precipitación con fosfato de calcio (Chen and Okayama, 1988) descrito previamente en técnicas de transfección.

Preparación de extractos celulares. Las células fueron lavadas 3 veces con 2 ml de PBS frío. Se agregó luego 1 ml de TEN frío para favorecer el despegado de las células. La monocapa celular fue levantada mediante el empleo de un "rastrillo de células" y cosechada en tubos eppendorf. Las células fueron centrifugadas a 1.000 x g durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue eliminado por aspiración y el pellet

celular resuspendido en 200 μ l de buffer Tris 250 mM pH 7,5 conteniendo glicerol 15%. Las células fueron lisadas sometiéndolas a 3 ciclos consecutivos, de 5 minutos cada uno, de congelamiento y descongelamiento en baño de etanol/hielo seco y baño de agua a 37 °C respectivamente, agitando vigorosamente cada vez. Finalmente, los tubos se centrifugaron a 1.000 x g 10 minutos a 4 °C para eliminar los restos celulares. El sobrenadante proteico se dividió en dos alícuotas para la posterior determinación de las actividades de β -galactosidasa y cloramfenicol acetiltransferasa.

TEN: Tris 20 mM, NaCl 100 mM y EDTA 1 mM.

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

$(A_{420nm} \text{ muestra} - A_{420nm} \text{ control}) / \mu\text{l extracto} \times \text{hora}$.

Buffer PM2: Na₂ HPO₄ 60 mM, NaH₂PO₄ 40 mM, KCl 10 mM y MgSO₄ 1 mM.

Determinación de la actividad de cloramfenicol acetiltransferasa (CAT). La actividad de la enzima CAT fue determinada según el método descrito por Seed y Sheen (Seed and Sheen, 1988). El extracto celular fue previamente calentado a 65 °C durante 5 minutos, con el propósito de inactivar las acetilasas endógenas. Se enfrió inmediatamente en hielo y se centrifugó 15 minutos a 1.500 x g a 4 °C para eliminar las proteínas desnaturalizadas. El ensayo fue realizado con 50 μ l de sobrenadante en una mezcla de reacción, descrita mas adelante, e incubando a 37 °C entre 90-120 minutos. A continuación se agregaron 200 μ l de xileno y luego de agitar vigorosamente, los incubados fueron centrifugados a 10.000 x g durante 15 minutos. Se separó la fase orgánica, la que fue sometida a una extracción reversa mediante el agregado de 200 μ l de H₂O. Luego de agitar y centrifugar bajo las mismas condiciones, la fase orgánica resultante, conteniendo los derivados butirilados de 3H-cloramfenicol, fue colocada en viales con líquido centelleante a base de tolueno (PPO 0,4%, dimetil POPOP 0,05% en tolueno) y se cuantificó la radioactividad en un contador de centelleo líquido. La actividad específica de CAT se determinó como (dpm pCMV-CAT – dpm control pBLCAT6)/ μ l x minuto). Las unidades CAT fueron

normalizadas contra las unidades β -galactosidasa, para ajustar los resultados de acuerdo con la eficiencia de transfección en cada caso.

Buffer de reacción: conteniendo Tris 100 mM pH 8, butiril-CoA 0,25 mg/ml y 200 nCi de ^3H -cloramfenicol (60 Ci/mmol, 0,01 mCi/ml).

Incorporación de ^3H -timidina.

Las células se sembraron en pocillos de 35 mm a razón de 2×10^5 células pocillo con medio completo, suplementado con 10% de suero fetal bovino. Inmediatamente luego del tratamiento correspondiente, las células fueron incubadas con $1 \mu\text{Ci/ml}$ ^3H -timidina (81 Ci/ mmol; Amersham Biosciences) durante 6 horas a 37°C , lavadas 3 veces con PBS frío, cosechadas y centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos. Luego fueron lisadas con 500 μl de 5% TCA por 30 minutos y centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. El pellet fue lavado dos veces con agua fría y resuspendido en 50 μl de 1 M NaOH durante 1 hora. La radioactividad incorporada fue cuantificada en un contador de centelleo. La proliferación celular fue estimada como dpm/ μg de proteína.

Ensayo de MTT: estimación de viabilidad celular

La viabilidad celular fue estimada con el ensayo de bromuro de 3-[4,5 dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Los clones de células de Leydig MA-10 estables para p19 sentido o p19 antisentido se sembraron en pocillos de 35 mm a razón de 2×10^5 células/pocillo con medio completo, suplementado con 10% de suero fetal bovino y se incubaron 24 horas. Las células fueron tratadas con las dosis indicadas de luz UV y la supervivencia celular fue evaluada en los diferentes tiempos reemplazando el medio de cultivo con 1 ml de medio fresco conteniendo MTT (Sigma) 1 mg/ml, e incubando las células otras 4-6 horas. El medio y el MTT fueron removidos y se agregaron 500 μl de isopropanol para disolver el precipitado de MTT reducido. Las placas fueron agitadas 15 minutos y la absorbancia en el solvente fue determinada a 570 nm. El blanco fue calculado utilizando mediciones a dos longitudes de onda a 570 y 650 nm. Se incluyeron controles de células no tratadas y de medio solo. En paralelo, se determinó el número de células viables por conteo en cámara de Neubauer con el colorante azul de tripán descripto previamente.

Ensayo clonogénico.

Luego de irradiar con UV células MA-10 estables para p19 sentido o p19 antisentido se determinó la supervivencia celular mediante un ensayo clonogénico. Las células fueron sembradas diluidas de modo de que queden aisladas (aprox. 1000 células /placa de 10 cm) y fueron irradiadas con 8 mJ/ cm² de UV luego de inducir el promotor de MT durante 6 horas con 75 µM ZnCl₂. Veinticuatro horas más tarde el medio fue reemplazado por medio fresco libre de ZnCl₂. Las células fueron incubadas 7 días y luego fijadas con formaldehído al 10% y tinción con el colorante cristal violeta (5 mg/ml en etanol) y cuantificación de los clones supervivientes. Las colonias que contenían más de 50 células fueron consideradas como derivadas de células clonogénicamente activas.

Ensayo del cometa

Las líneas MA-10 generadas (MA-10p19S, MA-10p19AS, MA-10p19empty) fueron sembradas en placas de 35 mm (3 x 10⁵ células/placa). Las células fueron irradiadas con 8 mJ/cm², en la ausencia de medio de cultivo. Inmediatamente luego de la exposición, el medio de cultivo fue agregado nuevamente y las células fueron incubadas en oscuridad a 37 °C por diferentes tiempos.

Aproximadamente 10⁵ células fueron suspendidas en 140 µl de agarosa de bajo punto de fusión pre-calentada (0,5%), preparada en PBS libre de calcio y magnesio. Sesenta y cinco µl de la suspensión fue rápidamente dispersada en portaobjetos enfriados a -20 °C precubiertos con 80 µl de agarosa de alto punto de fusión (0,8%) y cubiertas con cubreobjetos. La gelificación procedió por 10 minutos a 0 °C. Los cubreobjetos fueron removidos suavemente y los portaobjetos sumergidos en la solución de lisis por una hora a temperatura ambiente. Los portaobjetos fueron removidos de la solución de lisis e incubados en buffer de electroforesis nuevo por 40 minutos a temperatura ambiente para permitir el desenrollado del ADN. Luego de la electroforesis, los portaobjetos fueron lavados dos veces con buffer de neutralización. Los minigeles sobre los portaobjetos fueron dejados secar a temperatura ambiente. Luego fueron teñidos con 50 µl de una solución de bromuro de etidio (20 µg/ml) y observados a través de microscopía de fluorescencia (microscopio Nikon type 120). Los cometas fueron analizados y el momento de la cola de olive (*olive tail momento*) calculado usando el software CASP.

Solución de lisis: 2,5 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 10, 10 mM EDTA, 10% Me₂SO Triton X-100 ambos agregados al momento de utilizar.

Buffer de electroforesis: 300 mM NaOH; 1 mM EDTA pH >13.

Solución de neutralización: 400 mM Tris-ClH pH 7,5.

Análisis de aberraciones cromosómicas

Las líneas MA-10 generadas (MA-10p19S, MA-10p19AS, MA-10p19empty) fueron sembradas en placas de 35 mm (3×10^5 células/placa). Las células fueron irradiadas con 8 mJ/cm^2 , en la ausencia de medio de cultivo. Inmediatamente luego de la exposición, el medio de cultivo fue agregado nuevamente y las células fueron incubadas en estufa a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 horas.

Para la evaluación de aberraciones cromosómicas estructurales, el arresto mitótico fue iniciado 2 horas antes de cosechar las células por adición de colchicina ($0.2 \text{ } \mu\text{g/ml}$) y las células fueron tripsinizadas. Luego de la centrifugación, fueron resuspendidas en solución hipotónica calentada previamente (75 mM de KCl) por 30 minutos y la fijación fue llevada a cabo en metanol/ácido acético (3:1).

Los portaobjetos fueron teñidos con Giemsa 10% por 4 minutos. Para cada tratamiento 300 metafases fueron examinadas para la presencia de diferentes tipos de aberraciones estructurales. Intercambio de cromátidas, cromosomas dicéntricos y cromosomas en forma de anillos fueron evaluados como dos roturas. Metafases conteniendo más de 5 aberraciones fueron consideradas como células con múltiples aberraciones.

Ensayo de fosforilación

Marcación metabólica con ^{32}P . Las células, cultivadas en placas de 60 mm y tratadas o no con los diferentes agentes genotóxicos y/o inhibidores de quinasas, fueron incubadas durante tres horas antes de la preparación de los extractos celulares, con $0,5 \text{ mCi}$ de ^{32}P -ortofosfato de sodio. A diferentes tiempos, según lo indicado en los ensayos, las células fueron lavadas dos veces con 5 ml de PBS frío y recolectadas en 1 ml de PBS frío. Las muestras celulares fueron centrifugadas a $1500 \times g$, los lisados preparados por el agregado de $60 \text{ } \mu\text{l}$ de buffer RIPA en el pellet celular y conservadas en hielo por 20 minutos. Los lisados fueron centrifugados por 10 minutos a $10.000 \times g$. Los sobrenadantes fueron transvasados a tubos limpios y las proteínas cuantificadas mediante la técnica de Bradford.

Inmunoprecipitación de p19. A $100 \text{ } \mu\text{g}$ de proteínas del lisado se las sometió a inmunoprecipitación con $1 \text{ } \mu\text{g}$ de un anticuerpo, anti-p19 o anti-V5 según se indique, incubando la mezcla durante 2 horas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ con rotación. Luego se agregaron $20 \text{ } \mu\text{l}$ de

una solución de bolitas de agarosa acopladas a proteína A/G (Santa Cruz sc-2003) incubándose durante toda la noche a 4 °C con rotación. Los complejos inmunes se recuperaron por centrifugación a 1.000 rpm por 5 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó 3 veces con PBS y luego se resuspendió en 20 µl de PBS y en 20 µl de buffer de siembra 1X (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, β-mercaptoetanol 100 mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%).

Electroforesis en gel de poliacrilamida. En todos los casos las muestras fueron analizadas en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1970). Se utilizó la cuba vertical de Life Technologies (GIBCO BRL Vertical Gel Electrophoresis Apparatus, Model V15.17). El gel separador (inferior) se preparó al 12% (13,2 ml de agua destilada estéril, 15,9 ml de solución de acrilamida/bisacrilamida al 30%, 10 ml de Tris 1,5 M pH 8,8, 0,4 ml de SDS 10%, 0,4 ml de persulfato de amonio 10% y 16 µl de TEMED), y el gel concentrador (superior) se preparó al 5% (6,8 ml de agua destilada estéril, 1,7 ml de solución de acrilamida/bisacrilamida al 30%, 1,25 ml de Tris 1 M pH 6,8, 0,1 ml de SDS 10%, 0,1 ml de persulfato de amonio 10% y 10 µl de TEMED). Las muestras, con el buffer de siembra, se hirvieron durante 5 minutos antes de sembrarlas en el gel. En uno de los pocillos se sembraron 5 µl del marcador de peso molecular (*Bench Mark Prestained Protein Ladder*, Invitrogen). Luego se realizó la electroforesis, a 120 V, en buffer Tris-Glicina-SDS 1X (Tris base 25mM, glicina 250 mM pH 8,3, SDS 0,1%) hasta que el azul de bromofenol alcanzó el final del gel separador, aproximadamente 4 horas.

Secado del gel y exposición. Una vez concluida la separación electroforética, el gel fue colocado sobre un papel Whatman 3MM y secado al vacío y calor en un secador de geles (Slab Gel Dryer Model SE 1160, Pharmacia Biotech). Luego, el papel Whatman fue envuelto con nylon impermeable y expuesto en un cassette con pantalla radiográfica intensificadora (FUJIFILM) a temperatura ambiente entre 24 y 72 horas. Las pantallas fueron escaneadas en un analizador de imágenes Bio-Imaging Analyzer Fujifilm BAS-1800II, y la radioactividad resultante se cuantificó utilizando el programa ImageQuant, Amersham Biosciences.

Ensayos de fosforilación in vivo con Fraccionamiento Subcelular

Células WI-38 ó BHK-21 fueron sembradas en placas de 100 mm. En el caso de transfecciones en células BHK-21 estas fueron realizadas al alcanzar un 90% de confluencia (en general 24 horas luego de la siembra). Las transfecciones fueron realizadas con Lipofectamina 2000 reagent siguiendo el protocolo indicado por el fabricante utilizando 14 µg de vector total indicado en cada caso.

En el caso de las células transfectadas, la marcación metabólica con ^{32}P se realizó 24 horas luego de la transfección y como fue indicado anteriormente. Las células WI-38 fueron marcadas metabólicamente cuando alcanzaron un 90% o más de confluencia. Una vez aplicados los distintos daños, las células fueron cosechadas en los tiempos indicados. Las células fueron lavadas dos veces con 10 ml de PBS frío y recolectadas en 1ml de PBS frío. Las muestras fueron centrifugadas a $1.500 \times g$ por 5 minutos. Luego, el PBS es removido y el pellet resuspendido en $400 \mu\text{l}$ de buffer A aspirando suavemente con un *tip* amarillo. Las células fueron mantenidas en este medio hipotónico durante 15 minutos en hielo, después de los cuales $25 \mu\text{l}$ de una solución 10% de Nonidet P-40 fueron agregados y los tubos vortexeados vigorosamente por 10 segundos. El homogenato fue centrifugado por 30 segundos en una microcentrífuga. El sobrenadante, conteniendo la fracción citoplasmática, fue transferido a un tubo limpio. El pellet resuspendido en $55 \mu\text{l}$ de Buffer C y los tubos agitados vigorosamente a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos. Luego fueron centrifugados por 5 minutos a máxima velocidad y los sobrenadantes de la fracción nuclear congelados a -70°C . Las proteínas fueron cuantificadas por el ensayo de BCA para la cuantificación de proteínas.

Una cantidad de $250 \mu\text{g}$ de proteínas provenientes de las diferentes fracciones subcelulares fueron inmunoprecipitadas y analizadas por electroforesis en gel según fue descrito previamente.

Buffer A: 10 mM HEPES pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF.

Buffer C: 20 mM HEPES pH 7,9, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF.

Fosforilación *in vitro*

Ensayo de fosforilación del péptido de p19 por PKA

La fosforilación directa de p19 por PKA fue evaluada utilizando un péptido conteniendo la secuencia de la treonina 141 de p19. El ensayo fue realizado a través de la incubación del péptido de p19 (p-T141, $200 \mu\text{M}$) y la subunidad catalítica de PKA (PKAc) de corazón bovino (5 unidades por reacción) en el buffer de reacción a $30 \text{ }^\circ\text{C}$

en los tiempos indicados. Luego, los incubados fueron absorbidos en papel de fosfocelulosa y lavados 3 veces con agitación en 1 litro de H_3PO_4 . Los papeles conteniendo las muestras fueron secados, sumergidos en 1 ml de líquido centelleante Hisafe cada uno y la marca radiactiva en cada muestra determinada en un contador de centelleo. Como control de actividad de la enzima se utilizó un péptido sintético, sustrato de PKA, denominado Kémtido (200 μM), el cuál es derivado del sitio de fosforilación de la piruvato quinasa de hígado. Como control negativo se utilizó la mezcla conteniendo la enzima sin agregado de sustrato.

La actividad de la enzima está expresada en unidades: una unidad está definida como la cantidad de enzima que cataliza la incorporación de 1 pmol de fosfato a un sustrato proteico por minuto a pH 7,4 y a 30 °C. PKAc liofilizada fue reconstituída en 50 mM de ditionitrol.

Secuencia del Kémtido: LRRASLG

Secuencia del péptido de treonina 141 (p-T141): RDARGLTPLELA

Buffer de reacción: 50 mM Tris-Hcl pH 7,4, 0,1 mM EGTA, 0,1 mM EDTA, 15 mM Cl_2Mg , 10 mM β -mercaptoetanol, 0,1 mM [γ - ^{32}P] ATP (700 dpm/pmol), 0,1 mM ATP.

Ensayo de fosforilación de GST-p19 por PKA

En este ensayo se procedió como en el protocolo descrito previamente para el péptido p-T141 con algunas modificaciones. Las reacciones fueron llevadas a cabo en el mismo buffer descrito anteriormente con el agregado de inhibidores de proteasas. En este caso se evaluó la fosforilación de 2 μg GST-19 ó de GST utilizando 5 unidades de PKAc. Como control positivo de la actividad de PKA fue utilizada la proteína CREB recombinante expresada previamente en el laboratorio a partir de bacterias E.coli cepa BL21 (DE3) pLysS transformadas con el plásmido pET-CREB e inducidas por IPTG. La especificidad de la fosforilación por PKA se estudió mediante la adición al buffer de reacción del inhibidor de PKA, H-89 (100 μM). Como control negativo se evaluó la reacción de fosforilación sin el agregado de enzima. Las reacciones de fosforilación fueron evaluadas por electroforesis en gel de poliacrilamida como fue descrito previamente.

Buffer de reacción: 50 mM Tris-Hcl pH 7,4, 0,1 mM EGTA, 0,1 mM EDTA, 15 mM Cl_2Mg , 10 mM 2-mercaptoetanol, 0,1 mM [γ - ^{32}P] ATP (700

dpm/pmol), 0,1 mM ATP, PMSF 100 µg/ml, aprotinina 60 µg/ml y ortovanadato de sodio 1 mM.

Ensayo de fosforilación del péptido de p19 por CDK2 y CDK5

La fosforilación directa de p19 por CDK2 y CDK5 fue evaluada utilizando un péptido conteniendo la secuencia de la serina 76 de p19. El ensayo fue realizado a través de la incubación del péptido de p19 (p-S76, 200 µM) y CDK2 ó CDK5 inmunoprecipitadas de células HEK293 ó SH-SY5Y como se describe más adelante. La reacción de fosforilación fue llevada a cabo en buffer HB incubando p-S76 ó péptido de histona H1 a 37 °C en los tiempos indicados. Los sustratos fueron preparados en Buffer HB 2X y luego diluido por el agregado de un volumen igual de la enzima en buffer HB. Como control de actividad de la enzima se utilizó un péptido de la Histona H1 (200 µM). Como control negativo se utilizó la mezcla conteniendo la enzima sin agregado de sustrato.

Luego, los incubados fueron absorbidos en papel de fosfo celulosa y lavados 3 veces con agitación en 1 litro de H₃PO₄. Los papeles conteniendo las muestras fueron secados, sumergidos en 1 ml de líquido centelleante Hisafe cada uno y la marca radiactiva en cada muestra determinada en un contador de centelleo.

Secuencia del péptido de histona H1: PKTPKKAKKL

Secuencia del péptido de serina 76 (p-S76): RGTSPVHDAART

Buffer de reacción HB: 25 mM MOPS pH 7,2, 15 mM EGTA, 15 mM Cl₂Mg, 1 mM de DTT, 1% de Tritón-X100, 0,1 mM de vanadato de sodio, 1 mM de PMSF, 40 µg/ml aprotinina y 20 µg/ml leupeptina.

Buffer de reacción HB 2X: 25 mM MOPS pH 7,2, 15 mM EGTA, 15 mM Cl₂Mg, 1,1mM de DTT, 1% de Tritón-X100, 0,1mM de vanadato de sodio, 1 mM de PMSF, 40 µg/ml aprotinina y 20 µg/ml leupeptina, 200 µM ATP, 10 µCi/µl [γ -³²P] ATP (6000Ci/mmol, 10 Ci/µl).

Ensayo de fosforilación de GST-p19 por CDK2 y CDK5

En este ensayo se procedió como en el protocolo descrito previamente para el péptido p-S76 con algunas modificaciones. Las reacciones se llevaron a cabo empleando los mismos buffers descritos previamente. En este caso se evaluó la fosforilación de 8 μ g GST-19 ó de GST utilizando CDK2 ó CDK5 inmunoprecipitadas de células HEK293 ó SH-SY5Y como se describe más adelante. La reacción de fosforilación fue llevada a cabo en buffer HB incubando GST-p19 ó GST con la fuente de proteína indicada a 37 °C en los tiempos indicados. Los sustratos fueron preparados en Buffer HB 2X y luego diluido por el agregado de un volumen igual de la enzima en buffer HB. Como control de actividad de la enzima se utilizó histona H1 (1,5 μ g por reacción; 382150 Histone H1, Calf Thymus, Calbiochem). Como control negativo se utilizó la mezcla conteniendo el sustrato y el producto del proceso de inmunoprecipitado sin utilizar anticuerpo (sin enzima inmunoprecipitada). Las reacciones de fosforilación fueron evaluadas por electroforesis en gel de poliacrilamida como fue descrito en previamente.

Inmunoprecipitación de CDK2 ó CDK5

Células HEK-293T ó SH-SY5Y fueron sembradas en cajas de 100 mm, irradiadas con UV (4 mJ/cm²) y cosechadas en 1 ml de PBS. Luego de ser centrifugadas a 1.500 x g, fueron resuspendidas en 500 μ l de Buffer HB y mantenidas en hielo por 10 minutos. Luego, de una centrifugación a 10.000 x g los sobrenadantes fueron transvasados a un mismo tubo y las proteínas cuantificadas.

Para la inmunoprecipitación, por cada reacción de fosforilación se utilizó 1 mg de proteínas totales, 1 μ g de anticuerpo y 25 μ l de bolitas A/-G agarosa. La inmunoprecipitación procedió por 3 horas a 4 °C después de las cuales, los tubos fueron centrifugados, las bolitas de agarosa lavadas 3 veces con buffer HB y resuspendidas en 15 μ l de Buffer HB. A este volumen se agregaron 15 μ l del buffer de reacción HB 2X conteniendo los sustratos como fue descrito previamente.

Anticuerpos: CDC2 p34(C-19) sc-954, Santa Cruz. CDK2 (M2) sc-163, Santa Cruz.

Disminución de los niveles de las quinasas CDK1 y CDK2

La disminución en los niveles de las proteínas CDK1 y CDK2 fue llevado a cabo mediante la estrategia de oligonucleótidos antisentido. Se emplearon oligonucleótidos de aproximadamente 27 bases (46 a 73, ó 129 a 155 para CDK2 y CDK1 respectivamente). Las células fueron sembradas un día antes de la transfección. Se

utilizó Lipofectamina 200 reagent para introducir los oligonucleótidos en las células. La concentración final utilizada para cada uno fue 1 μM . Doce horas luego de la transfección el medio fue reemplazado por medio conteniendo una concentración de 1 μM del oligonucleótido correspondiente. Doce horas después, las células fueron dañadas o no con luz UV (4 mJ/cm^2) y cosechadas en los tiempos indicados. Para el análisis de Northern blot el procesamiento de las muestras se realizó según lo indicado en el protocolo descrito previamente al igual que en el caso de análisis de fosforilación de p19. En el caso del análisis de Northern blot, los mismos oligonucleótidos mencionados fueron utilizados en la detección por esta técnica. La disminución en los niveles de proteínas CDK1 y CDK2 fue analizada por Western blot con los anticuerpos señalados previamente.

Oligonucleótido AS CDK1: 5' TAT TTT GGT ATT ATC TTC CAT AGT TAG 3'

Oligonucleótido AS CDK2: 5' CCA ACT TGA AAC AAT CTT GCC GCC TCC C 3'

Interacción de p19 y PKA *in vivo*

Células BHK-21 fueron sembradas en placas de 100 mm un día antes de la transfección. Se utilizó el protocolo de Lipofectamina 2000 reagent transfectando 9 μg de los vectores de expresión pcADN4C-p19wt y/o 9 μg del vector pCMV-HA-PKACA (cedido gentilmente por Laura Pasqualucci M.D. del Irving Cancer Research Center) según es indicado. Luego de 24 horas, las células fueron dañadas con luz UV (4 mJ/cm^2) y cosechadas en los tiempos indicados. La lisis celular fue realizada con 650 μl del buffer descrito más adelante, durante 20 minutos en hielo. Luego de la centrifugación, 600 μg de proteínas fueron inmunoprecipitadas con 1,5 μg del anticuerpo anti-V5 y 30 μl de bolitas de A/G-agarosa. La inmunoprecipitación procedió durante toda la noche a 4 $^{\circ}\text{C}$, luego de lo cual, los complejos inmunoprecipitados fueron lavados tres veces con el buffer de lisis y resuspendidos en el mismo buffer. Los complejos fueron analizados por electroforesis y Western blot.

Buffer de Lisis: 1 M de Tris-HCL pH 7,5, 1 M sacarosa, 100 mM ortovanadato de sodio, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 50 mM de NaF, 10% Tritón X-100, 10 mM β -mercaptoetanol, cocktail de inhibidores de proteasas (Roche Applied Science, # catálogo 11836170001).

Inducción y purificación de GST-p19

p19 humana fue expresada y purificada a partir de la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLys (Novagen) como una proteína de fusión con GST (*Glutathione S-Transferase*), a partir del vector pGEX 2T (Pharmacia Biotech). Para la expresión, un cultivo en LB de 16 horas, fue diluido 10 veces y crecido en agitación a 37 °C hasta una O.D. de 0,6. La inducción de la expresión de GST-p19 se realizó por el agregado de IPTG en una concentración final de 0,4 mM y posterior incubación por 4 horas en agitación a 37 °C. Luego de este tiempo, el cultivo fue centrifugado a 3000 x g. El pellet fue resuspendido en PBS frío, sonicado y purificado utilizando una resina de glutatión - agarosa (SIGMA cat# G4510) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Fracciones del proceso de expresión y de purificación fueron analizadas por SDS-PAGE y por tinción con Coomassie Blue.

Técnica de Doble Híbrido en levaduras

El estudio de interactores de p19 por la técnica de doble híbrido en levaduras fue realizada utilizando el sistema CytoTrap® two-hybrid system (Stratagene, número de catálogo 217438), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

La proteína p19 humana fue subclonada entre los sitios BamHI y Sall el vector pSos amplificando el ADNc con los siguientes primers:

primer forward: 5' CGGGATCCTCATGCTGCTGGAGGAGGTTTCG 3'

primer reverse: 5' AGCGTCGACTCACAGCGGGGCCACCATGTG 3'

Se resaltan los sitios de corte para las enzimas de restricción.

Análisis de estructura y simulación de fosforilación de p19

El análisis de la estructura de p19 que esta fue realizado utilizando el programa VMD (Visual Molecular Dynamics, <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>).

Los cálculos o simulaciones de la proteína en cada estado fueron obtenidos con el

programa AMBER. Los graficos XY fueron realizados con el programa XMGRACE.

REFERENCIAS

Abraham, R.T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & development* 15, 2177-2196.

Adams, K.E., Medhurst, A.L., Dart, D.A., and Lakin, N.D. (2006). Recruitment of ATR to sites of ionising radiation-induced ADN damage requires ATM and components of the MRN protein complex. *Oncogene* 25, 3894-3904.

Aksenov, M.Y., Aksenova, M.V., Carney, J.M., and Butterfield, D.A. (1997). Oxidative modification of glutamine synthetase by amyloid beta peptide. *Free Radic Res* 27, 267-281.

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

- Aylon, Y., Liefshitz, B., and Kupiec, M. (2004). The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle. *The EMBO journal* 23, 4868-4875.
- Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B. (2003). ADN damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499-506.
- Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* 3, 421-429.
- Bartek, J., and Lukas, J. (2007). ADN damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol* 19, 238-245.
- Bartkova, J., Thullberg, M., Rajpert-De Meyts, E., Skakkebaek, N.E., and Bartek, J. (2000). Lack of p19INK4d in human testicular germ-cell tumours contrasts with high expression during normal spermatogenesis. *Oncogene* 19, 4146-4150.
- Batty, D.P., and Wood, R.D. (2000). Damage recognition in nucleotide excision repair of ADN. *Gene* 241, 193-204.
- Beard, D.A., and Schlick, T. (2001). Computational modeling predicts the structure and dynamics of chromatin fiber. *Structure* 9, 105-114.
- Berger, S.L. (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Current opinion in genetics & development* 12, 142-148.
- Berger, S.L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447, 407-412.
- Bode, A.M., and Dong, Z. (2004). Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 4, 793-805.
- Branzei, D., and Foiani, M. (2008). Regulation of ADN repair throughout the cell cycle. *Nature reviews* 9, 297-308.
- Brotherton, D.H., Dhanaraj, V., Wick, S., Brizuela, L., Domaille, P.J., Volyanik, E., Xu, X., Parisini, E., Smith, B.O., Archer, S.J., *et al.* (1998). Crystal structure of the complex of the cyclin D-dependent kinase Cdk6 bound to the cell-cycle inhibitor p19INK4d. *Nature* 395, 244-250.
- Brown, E.J., and Baltimore, D. (2000). ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes & development* 14, 397-402.
- Bruce, J.L., Hurford, R.K., Jr., Classon, M., Koh, J., and Dyson, N. (2000). Requirements for cell cycle arrest by p16INK4a. *Mol Cell* 6, 737-742.
- Bruner, S.D., Norman, D.P., and Verdine, G.L. (2000). Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in ADN. *Nature* 403, 859-866.
- Butterfield, D.A., Hensley, K., Harris, M., Mattson, M., and Carney, J. (1994). beta-Amyloid peptide free radical fragments initiate synaptosomal lipoperoxidation in a sequence-specific fashion: implications to Alzheimer's disease. *Biochemical and biophysical research communications* 200, 710-715.
- Cadet, J., Berger, M., Douki, T., and Ravanat, J.L. (1997). Oxidative damage to ADN: formation, measurement, and biological significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 131, 1-87.
- Carcagno, A.L., Ogara, M.F., Sonzogni, S.V., Marazita, M.C., Sirkin, P.F., Ceruti, J.M., and Canepa, E.T. (2009). E2F1 transcription is induced by genotoxic stress through ATM/ATR activation. *IUBMB life* 61, 537-543.
- Cardozo, T., and Pagano, M. (2004). The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nature reviews* 5, 739-751.

- Caspari, T., Murray, J.M., and Carr, A.M. (2002). Cdc2-cyclin B kinase activity links Crb2 and Rqh1-topoisomerase III. *Genes & development* 16, 1195-1208.
- Cerqueira, A., Santamaria, D., Martinez-Pastor, B., Cuadrado, M., Fernandez-Capetillo, O., and Barbacid, M. (2009). Overall Cdk activity modulates the ADN damage response in mammalian cells. *The Journal of cell biology* 187, 773-780.
- Ceruti, J.M., Scassa, M.E., Flo, J.M., Varone, C.L., and Canepa, E.T. (2005). Induction of p19INK4d in response to ultraviolet light improves ADN repair and confers resistance to apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene* 24, 4065-4080.
- Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J., and Elledge, S.J. (2001). ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science* 294, 1713-1716.
- Costelloe, T., Fitzgerald, J., Murphy, N.J., Flaus, A., and Lowndes, N.F. (2006). Chromatin modulation and the ADN damage response. *Experimental cell research* 312, 2677-2686.
- Cuadrado, M., Martinez-Pastor, B., Murga, M., Toledo, L.I., Gutierrez-Martinez, P., Lopez, E., and Fernandez-Capetillo, O. (2006). ATM regulates ATR chromatin loading in response to ADN double-strand breaks. *J Exp Med* 203, 297-303.
- Chan, F.K., Zhang, J., Cheng, L., Shapiro, D.N., and Winoto, A. (1995). Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4. *Mol Cell Biol* 15, 2682-2688.
- Chatterjee, R., Haines, G.A., Perera, D.M., Goldstone, A., and Morris, I.D. (2000). Testicular and sperm ADN damage after treatment with fludarabine for chronic lymphocytic leukaemia. *Human reproduction (Oxford, England)* 15, 762-766.
- Chen, X., Zhang, J., Lee, J., Lin, P.S., Ford, J.M., Zheng, N., and Zhou, P. (2006). A kinase-independent function of c-Abl in promoting proteolytic destruction of damaged ADN binding proteins. *Molecular cell* 22, 489-499.
- Chen, X., Zhang, Y., Douglas, L., and Zhou, P. (2001). UV-damaged ADN-binding proteins are targets of CUL-4A-mediated ubiquitination and degradation. *The Journal of biological chemistry* 276, 48175-48182.
- Childs, K.S., and Goodbourn, S. (2003). Identification of novel co-repressor molecules for Interferon Regulatory Factor-2. *Nucleic acids research* 31, 3016-3026.
- Chipchase, M.D., and Melton, D.W. (2002). The formation of UV-induced chromosome aberrations involves ERCC1 and XPF but not other nucleotide excision repair genes. *ADN repair* 1, 335-340.
- Das, C., Lucia, M.S., Hansen, K.C., and Tyler, J.K. (2009). CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56. *Nature* 459, 113-117.
- de Gruijl, F.R., and Rebel, H. (2008). Early events in UV carcinogenesis--ADN damage, target cells and mutant p53 foci. *Photochem Photobiol* 84, 382-387.
- de Klein, A., Muijtjens, M., van Os, R., Verhoeven, Y., Smit, B., Carr, A.M., Lehmann, A.R., and Hoeijmakers, J.H. (2000). Targeted disruption of the cell-cycle checkpoint gene ATR leads to early embryonic lethality in mice. *Curr Biol* 10, 479-482.
- de Laat, W.L., Jaspers, N.G., and Hoeijmakers, J.H. (1999). Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes & development* 13, 768-785.
- Deans, A.J., Khanna, K.K., McNees, C.J., Mercurio, C., Heierhorst, J., and McArthur, G.A. (2006). Cyclin-dependent kinase 2 functions in normal ADN repair and is a therapeutic target in BRCA1-deficient cancers. *Cancer research* 66, 8219-8226.
- Del Bene, F., Tessmar-Raible, K., and Wittbrodt, J. (2004). Direct interaction of geminin and Six3 in eye development. *Nature* 427, 745-749.

- Delacote, F., and Lopez, B.S. (2008). Importance of the cell cycle phase for the choice of the appropriate DSB repair pathway, for genome stability maintenance: the trans-S double-strand break repair model. *Cell Cycle* 7, 33-38.
- Donzelli, M., and Draetta, G.F. (2003). Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep* 4, 671-677.
- Elledge, S.J. (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274, 1664-1672.
- Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D., and Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33, 389-396.
- Ewen, M.E., Sluss, H.K., Sherr, C.J., Matsushime, H., Kato, J., and Livingston, D.M. (1993). Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 73, 487-497.
- Falck, J., Coates, J., and Jackson, S.P. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and ADN-PKcs to sites of ADN damage. *Nature* 434, 605-611.
- Fleck, O., and Nielsen, O. (2004). ADN repair. *J Cell Sci* 117, 515-517.
- Fotedar, R., Bendjennat, M., and Fotedar, A. (2004). Role of p21WAF1 in the cellular response to UV. *Cell Cycle* 3, 134-137.
- Fraga, M.F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., Bonaldi, T., Haydon, C., Roper, S., Petrie, K., *et al.* (2005). Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* 37, 391-400.
- Franken, N.A., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J., and van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 1, 2315-2319.
- Friedberg, E.C. (2001). How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 22-33.
- Furukawa, M., Zhang, Y., McCarville, J., Ohta, T., and Xiong, Y. (2000). The CUL1 C-terminal sequence and ROC1 are required for efficient nuclear accumulation, NEDD8 modification, and ubiquitin ligase activity of CUL1. *Molecular and cellular biology* 20, 8185-8197.
- Gironella, M., Malicet, C., Cano, C., Sandi, M.J., Hamidi, T., Tauil, R.M., Baston, M., Valaco, P., Moreno, S., Lopez, F., *et al.* (2009). p8/nupr1 regulates ADN-repair activity after double-strand gamma irradiation-induced ADN damage. *Journal of cellular physiology* 221, 594-602.
- Goldenberg, S.J., Cascio, T.C., Shumway, S.D., Garbutt, K.C., Liu, J., Xiong, Y., and Zheng, N. (2004). Structure of the Cand1-Cul1-Roc1 complex reveals regulatory mechanisms for the assembly of the multisubunit cullin-dependent ubiquitin ligases. *Cell* 119, 517-528.
- Guan, K.L., Jenkins, C.W., Li, Y., O'Keefe, C.L., Noh, S., Wu, X., Zariwala, M., Matera, A.G., and Xiong, Y. (1996). Isolation and characterization of p19INK4d, a p16-related inhibitor specific to CDK6 and CDK4. *Mol Biol Cell* 7, 57-70.
- Guardavaccaro, D., and Pagano, M. (2006). Stabilizers and destabilizers controlling cell cycle oscillators. *Mol Cell* 22, 1-4.
- Hahn, W.C., and Weinberg, R.A. (2002). Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 331-341.
- Hanawalt, P.C., Ford, J.M., and Lloyd, D.R. (2003). Functional characterization of global genomic ADN repair and its implications for cancer. *Mutat Res* 544, 107-114.

- Hannon, G.J., and Beach, D. (1994). p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 371, 257-261.
- Harper, J.W., and Elledge, S.J. (2007). The ADN damage response: ten years after. *Molecular cell* 28, 739-745.
- Hartlerode, A.J., and Scully, R. (2009). Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *Biochem J* 423, 157-168.
- Hengst, L., and Reed, S.I. (1998). Inhibitors of the Cip/Kip family. *Curr Top Microbiol Immunol* 227, 25-41.
- Herrup, K., and Yang, Y. (2007). Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? *Nat Rev Neurosci* 8, 368-378.
- Hirai, H., Roussel, M.F., Kato, J.Y., Ashmun, R.A., and Sherr, C.J. (1995). Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Molecular and cellular biology* 15, 2672-2681.
- Hirama, T., and Koeffler, H.P. (1995). Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood* 86, 841-854.
- Hoeijmakers, J.H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366-374.
- Hu, J., McCall, C.M., Ohta, T., and Xiong, Y. (2004). Targeted ubiquitination of CDT1 by the DDB1-CUL4A-ROC1 ligase in response to ADN damage. *Nature cell biology* 6, 1003-1009.
- Huertas, P., Cortes-Ledesma, F., Sartori, A.A., Aguilera, A., and Jackson, S.P. (2008). CDK targets Sae2 to control ADN-end resection and homologous recombination. *Nature* 455, 689-692.
- Huertas, P., and Jackson, S.P. (2009). Human CtIP mediates cell cycle control of ADN end resection and double strand break repair. *The Journal of biological chemistry* 284, 9558-9565.
- Ira, G., Pelliccioli, A., Balijja, A., Wang, X., Fiorani, S., Carotenuto, W., Liberi, G., Bressan, D., Wan, L., Hollingsworth, N.M., *et al.* (2004). ADN end resection, homologous recombination and ADN damage checkpoint activation require CDK1. *Nature* 431, 1011-1017.
- Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G.C., Lukas, J., and Jackson, S.P. (2006). ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to ADN double-strand breaks. *Nature cell biology* 8, 37-45.
- Jha, S., Shibata, E., and Dutta, A. (2008). Human Rvb1/Tip49 is required for the histone acetyltransferase activity of Tip60/NuA4 and for the downregulation of phosphorylation on H2AX after ADN damage. *Molecular and cellular biology* 28, 2690-2700.
- Johnson, J.M., and Latimer, J.J. (2005). Analysis of ADN repair using transfection-based host cell reactivation. *Methods Mol Biol* 291, 321-335.
- Kadyrov, F.A., Genschel, J., Fang, Y., Penland, E., Edelmann, W., and Modrich, P. (2009). A possible mechanism for exonuclease 1-independent eukaryotic mismatch repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 8495-8500.
- Kaesler, M.D., Aslanian, A., Dong, M.Q., Yates, J.R., 3rd, and Emerson, B.M. (2008). BRD7, a novel PBAF-specific SWI/SNF subunit, is required for target gene activation and repression in embryonic stem cells. *The Journal of biological chemistry* 283, 32254-32263.
- Kayukawa, K., Makino, Y., Yogosawa, S., and Tamura, T. (1999). A serine residue in the N-terminal acidic region of rat RPB6, one of the common subunits of RNA

polymerases, is exclusively phosphorylated by casein kinase II in vitro. *Gene* 234, 139-147.

Khodjakov, A., and Rieder, C.L. (2009). The nature of cell-cycle checkpoints: facts and fallacies. *J Biol* 8, 88.

Kim, J.H., Yang, C.K., Heo, K., Roeder, R.G., An, W., and Stallcup, M.R. (2008). CCAR1, a key regulator of mediator complex recruitment to nuclear receptor transcription complexes. *Molecular cell* 31, 510-519.

Kim, J.R., Lee, S.R., Chung, H.J., Kim, S., Baek, S.H., Kim, J.H., and Kim, Y.S. (2003). Identification of amyloid beta-peptide responsive genes by cADN microarray technology: involvement of RTP801 in amyloid beta-peptide toxicity. *Exp Mol Med* 35, 403-411.

Klungland, A., Rosewell, I., Hollenbach, S., Larsen, E., Daly, G., Epe, B., Seeberg, E., Lindahl, T., and Barnes, D.E. (1999). Accumulation of premutagenic ADN lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13300-13305.

Kondo, T., Higashi, H., Nishizawa, H., Ishikawa, S., Ashizawa, S., Yamada, M., Makita, Z., Koike, T., and Hatakeyama, M. (2001). Involvement of pRB-related p107 protein in the inhibition of S phase progression in response to genotoxic stress. *J Biol Chem* 276, 17559-17567.

Kondo, T., Matsumoto, K., and Sugimoto, K. (1999). Role of a complex containing Rad17, Mec3, and Ddc1 in the yeast ADN damage checkpoint pathway. *Mol Cell Biol* 19, 1136-1143.

Kozlov, S.V., Graham, M.E., Peng, C., Chen, P., Robinson, P.J., and Lavin, M.F. (2006). Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. *The EMBO journal* 25, 3504-3514.

Kroll, K.L., Salic, A.N., Evans, L.M., and Kirschner, M.W. (1998). Geminin, a neuralizing molecule that demarcates the future neural plate at the onset of gastrulation. *Development (Cambridge, England)* 125, 3247-3258.

Laurent, E., Mitchell, D.L., Estrov, Z., Lowery, M., Tucker, S.L., Talpaz, M., and Kurzrock, R. (2003). Impact of p210(Bcr-Abl) on ultraviolet C wavelength-induced ADN damage and repair. *Clin Cancer Res* 9, 3722-3730.

Leibeling, D., Laspe, P., and Emmert, S. (2006). Nucleotide excision repair and cancer. *J Mol Histol* 37, 225-238.

Li, M., Stukenberg, P.T., and Brautigan, D.L. (2008). Binding of phosphatase inhibitor-2 to prolyl isomerase Pin1 modifies specificity for mitotic phosphoproteins. *Biochemistry* 47, 292-300.

Lin, W.C., Lin, F.T., and Nevins, J.R. (2001). Selective induction of E2F1 in response to ADN damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes & development* 15, 1833-1844.

Lindahl, T., and Barnes, D.E. (2000). Repair of endogenous ADN damage. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 65, 127-133.

Lindahl, T., Prigent, C., Barnes, D.E., Lehmann, A.R., Satoh, M.S., Roberts, E., Nash, R.A., Robins, P., and Daly, G. (1993). ADN joining in mammalian cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 58, 619-624.

Lindahl, T., and Wood, R.D. (1999). Quality control by ADN repair. *Science* 286, 1897-1905.

Liu, J., Furukawa, M., Matsumoto, T., and Xiong, Y. (2002). NEDD8 modification of CUL1 dissociates p120(CAND1), an inhibitor of CUL1-SKP1 binding and SCF ligases. *Molecular cell* 10, 1511-1518.

- Lovell, M.A., Gabbita, S.P., and Markesbery, W.R. (1999). Increased ADN oxidation and decreased levels of repair products in Alzheimer's disease ventricular CSF. *J Neurochem* 72, 771-776.
- Low, C., Homeyer, N., Weininger, U., Sticht, H., and Balbach, J. (2009). Conformational switch upon phosphorylation: human CDK inhibitor p19INK4d between the native and partially folded state. *ACS chemical biology* 4, 53-63.
- Lukas, C., Bartkova, J., Latella, L., Falck, J., Mailand, N., Schroeder, T., Sehested, M., Lukas, J., and Bartek, J. (2001). ADN damage-activated kinase Chk2 is independent of proliferation or differentiation yet correlates with tissue biology. *Cancer research* 61, 4990-4993.
- Lukas, C., Falck, J., Bartkova, J., Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by ADN damage. *Nature cell biology* 5, 255-260.
- Lukas, J., Lukas, C., and Bartek, J. (2004). Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *ADN Repair (Amst)* 3, 997-1007.
- Luo, L., and Kessel, M. (2004). Geminin coordinates cell cycle and developmental control. *Cell Cycle* 3, 711-714.
- Luo, L., Yang, X., Takihara, Y., Knoetgen, H., and Kessel, M. (2004). The cell-cycle regulator geminin inhibits Hox function through direct and polycomb-mediated interactions. *Nature* 427, 749-753.
- Lyapina, S.A., Correll, C.C., Kipreos, E.T., and Deshaies, R.J. (1998). Human CUL1 forms an evolutionarily conserved ubiquitin ligase complex (SCF) with SKP1 and an F-box protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7451-7456.
- Lydall, D., and Whitehall, S. (2005). Chromatin and the ADN damage response. *ADN repair* 4, 1195-1207.
- Makino, Y., Yogosawa, S., Kayukawa, K., Coin, F., Egly, J.M., Wang, Z., Roeder, R.G., Yamamoto, K., Muramatsu, M., and Tamura, T. (1999). TATA-Binding protein-interacting protein 120, TIP120, stimulates three classes of eukaryotic transcription via a unique mechanism. *Molecular and cellular biology* 19, 7951-7960.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 222-231.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* 30, 630-641.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9, 153-166.
- Markesbery, W.R. (1997). Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free radical biology & medicine* 23, 134-147.
- Martin, J., Hunt, S.L., Dubus, P., Sotillo, R., Nehme-Pelluard, F., Magnuson, M.A., Parlow, A.F., Malumbres, M., Ortega, S., and Barbacid, M. (2003). Genetic rescue of Cdk4 null mice restores pancreatic beta-cell proliferation but not homeostatic cell number. *Oncogene* 22, 5261-5269.
- Massague, J. (2004). G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 432, 298-306.
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., 3rd, Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., *et al.* (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to ADN damage. *Science* 316, 1160-1166.

- McGarry, T.J., and Kirschner, M.W. (1998). Geminin, an inhibitor of ADN replication, is degraded during mitosis. *Cell* 93, 1043-1053.
- Meyerson, M., Enders, G.H., Wu, C.L., Su, L.K., Gorka, C., Nelson, C., Harlow, E., and Tsai, L.H. (1992). A family of human cdc2-related protein kinases. *The EMBO journal* 11, 2909-2917.
- Meyerson, M., and Harlow, E. (1994). Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol* 14, 2077-2086.
- Min, K.W., Hwang, J.W., Lee, J.S., Park, Y., Tamura, T.A., and Yoon, J.B. (2003). TIP120A associates with cullins and modulates ubiquitin ligase activity. *The Journal of biological chemistry* 278, 15905-15910.
- Min, K.W., Kwon, M.J., Park, H.S., Park, Y., Yoon, S.K., and Yoon, J.B. (2005). CAND1 enhances deneddylation of CUL1 by COP9 signalosome. *Biochemical and biophysical research communications* 334, 867-874.
- Minshull, J., Golsteyn, R., Hill, C.S., and Hunt, T. (1990). The A- and B-type cyclin associated cdc2 kinases in *Xenopus* turn on and off at different times in the cell cycle. *Embo J* 9, 2865-2875.
- Miranda, S., Opazo, C., Larrondo, L.F., Munoz, F.J., Ruiz, F., Leighton, F., and Inestrosa, N.C. (2000). The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 62, 633-648.
- Mitchell, J.R., Hoeijmakers, J.H., and Niedernhofer, L.J. (2003). Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing. *Curr Opin Cell Biol* 15, 232-240.
- Mochan, T.A., Venere, M., DiTullio, R.A., Jr., and Halazonetis, T.D. (2004). 53BP1, an activator of ATM in response to ADN damage. *ADN repair* 3, 945-952.
- Morgan, D.O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 261-291.
- Muller-Tidow, C., Ji, P., Diederichs, S., Potratz, J., Baumer, N., Kohler, G., Cauvet, T., Choudary, C., van der Meer, T., Chan, W.Y., *et al.* (2004). The cyclin A1-CDK2 complex regulates ADN double-strand break repair. *Molecular and cellular biology* 24, 8917-8928.
- Murr, R., Loizou, J.I., Yang, Y.G., Cuenin, C., Li, H., Wang, Z.Q., and Herceg, Z. (2006). Histone acetylation by Trapp-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of ADN double-strand breaks. *Nature cell biology* 8, 91-99.
- Murray, A.W. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116, 221-234.
- Myers, J.S., and Cortez, D. (2006). Rapid activation of ATR by ionizing radiation requires ATM and Mre11. *The Journal of biological chemistry* 281, 9346-9350.
- Myers, J.S., Zhao, R., Xu, X., Ham, A.J., and Cortez, D. (2007). Cyclin-dependent kinase 2 dependent phosphorylation of ATRIP regulates the G2-M checkpoint response to ADN damage. *Cancer research* 67, 6685-6690.
- Nag, A., Bondar, T., Shiv, S., and Raychaudhuri, P. (2001). The xeroderma pigmentosum group E gene product DDB2 is a specific target of cullin 4A in mammalian cells. *Molecular and cellular biology* 21, 6738-6747.
- Nakayama, K., and Nakayama, K. (1998). Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors: brakes of the cell cycle engine during development. *Bioessays* 20, 1020-1029.
- Nguyen, H., Hiscott, J., and Pitha, P.M. (1997). The growing family of interferon regulatory factors. *Cytokine Growth Factor Rev* 8, 293-312.

- Niida, H., and Nakanishi, M. (2006). ADN damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis* 21, 3-9.
- Norbury, C., and Nurse, P. (1992). Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem* 61, 441-470.
- Nurse, P. (2000). A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* 100, 71-78.
- O'Driscoll, M., and Jeggo, P. (2002). Immunological disorders and ADN repair. *Mutat Res* 509, 109-126.
- Ortega, S., Malumbres, M., and Barbacid, M. (2002). Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1602, 73-87.
- Oshikawa, K., Matsumoto, M., Yada, M., Kamura, T., Hatakeyama, S., and Nakayama, K.I. (2003). Preferential interaction of TIP120A with Cul1 that is not modified by NEDD8 and not associated with Skp1. *Biochemical and biophysical research communications* 303, 1209-1216.
- Pardee, A.B. (1974). A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 1286-1290.
- Pardee, A.B. (1989). G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246, 603-608.
- Park, K.S., Mohapatra, D.P., Misonou, H., and Trimmer, J.S. (2006). Graded regulation of the Kv2.1 potassium channel by variable phosphorylation. *Science* 313, 976-979.
- Pavletich, N.P. (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* 287, 821-828.
- Peeper, D.S., Parker, L.L., Ewen, M.E., Toebes, M., Hall, F.L., Xu, M., Zantema, A., van der Eb, A.J., and Piwnicka-Worms, H. (1993). A- and B-type cyclins differentially modulate substrate specificity of cyclin-cdk complexes. *Embo J* 12, 1947-1954.
- Pei, X.H., and Xiong, Y. (2005). Biochemical and cellular mechanisms of mammalian CDK inhibitors: a few unresolved issues. *Oncogene* 24, 2787-2795.
- Peng, C., Zhou, J., Liu, H.Y., Zhou, M., Wang, L.L., Zhang, Q.H., Yang, Y.X., Xiong, W., Shen, S.R., Li, X.L., *et al.* (2006). The transcriptional regulation role of BRD7 by binding to acetylated histone through bromodomain. *J Cell Biochem* 97, 882-892.
- Peterson, C.L., and Cote, J. (2004). Cellular machineries for chromosomal ADN repair. *Genes & development* 18, 602-616.
- Petrini, J.H., and Stracker, T.H. (2003). The cellular response to ADN double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends Cell Biol* 13, 458-462.
- Pines, J., and Hunter, T. (1989). Isolation of a human cyclin cADN: evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34cdc2. *Cell* 58, 833-846.
- Pines, J., and Hunter, T. (1990). Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature* 346, 760-763.
- Plumb, J.A. (2004). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Med* 88, 165-169.
- Quinn, L.M., Herr, A., McGarry, T.J., and Richardson, H. (2001). The Drosophila Geminin homolog: roles for Geminin in limiting ADN replication, in anaphase and in neurogenesis. *Genes & development* 15, 2741-2754.

- Rabik, C.A., and Dolan, M.E. (2007). Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer treatment reviews* 33, 9-23.
- Ravanat, J.L., Douki, T., and Cadet, J. (2001). Direct and indirect effects of UV radiation on ADN and its components. *J Photochem Photobiol B* 63, 88-102.
- Rea, S., Xouri, G., and Akhtar, A. (2007). Males absent on the first (MOF): from flies to humans. *Oncogene* 26, 5385-5394.
- Rishi, A.K., Zhang, L., Boyanapalli, M., Wali, A., Mohammad, R.M., Yu, Y., Fontana, J.A., Hatfield, J.S., Dawson, M.I., Majumdar, A.P., *et al.* (2003). Identification and characterization of a cell cycle and apoptosis regulatory protein-1 as a novel mediator of apoptosis signaling by retinoid CD437. *The Journal of biological chemistry* 278, 33422-33435.
- Rishi, A.K., Zhang, L., Yu, Y., Jiang, Y., Nautiyal, J., Wali, A., Fontana, J.A., Levi, E., and Majumdar, A.P. (2006). Cell cycle- and apoptosis-regulatory protein-1 is involved in apoptosis signaling by epidermal growth factor receptor. *The Journal of biological chemistry* 281, 13188-13198.
- Rouse, J., and Jackson, S.P. (2002). Interfaces between the detection, signaling, and repair of ADN damage. *Science* 297, 547-551.
- Roussel, M.F. (1999). The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* 18, 5311-5317.
- Ruas, M., and Peters, G. (1998). The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta* 1378, F115-177.
- Rubbi, C.P., and Milner, J. (2003). p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of ADN damage. *Embo J* 22, 975-986.
- Saha, A., Wittmeyer, J., and Cairns, B.R. (2006). Chromatin remodelling: the industrial revolution of ADN around histones. *Nature reviews* 7, 437-447.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kacmaz, K., and Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian ADN repair and the ADN damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 73, 39-85.
- Sancar, A., and Reardon, J.T. (2004). Nucleotide excision repair in *E. coli* and man. *Advances in protein chemistry* 69, 43-71.
- Sandal, T. (2002). Molecular aspects of the mammalian cell cycle and cancer. *Oncologist* 7, 73-81.
- Sarker, A.H., Tsutakawa, S.E., Kostek, S., Ng, C., Shin, D.S., Peris, M., Campeau, E., Tainer, J.A., Nogales, E., and Cooper, P.K. (2005). Recognition of RNA polymerase II and transcription bubbles by XPG, CSB, and TFIIH: insights for transcription-coupled repair and Cockayne Syndrome. *Molecular cell* 20, 187-198.
- Satyanarayana, A., Berthet, C., Lopez-Molina, J., Coppola, V., Tessarollo, L., and Kaldis, P. (2008). Genetic substitution of Cdk1 by Cdk2 leads to embryonic lethality and loss of meiotic function of Cdk2. *Development (Cambridge, England)* 135, 3389-3400.
- Schippling, S., Kontush, A., Arlt, S., Buhmann, C., Sturenburg, H.J., Mann, U., Muller-Thomsen, T., and Beisiegel, U. (2000). Increased lipoprotein oxidation in Alzheimer's disease. *Free radical biology & medicine* 28, 351-360.
- Seo, S., Herr, A., Lim, J.W., Richardson, G.A., Richardson, H., and Kroll, K.L. (2005). Geminin regulates neuronal differentiation by antagonizing Brg1 activity. *Genes & development* 19, 1723-1734.
- Serrano, M., Hannon, G.J., and Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366, 704-707.

- Sherr, C.J. (2000). The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 60, 3689-3695.
- Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & development* 13, 1501-1512.
- Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (2004). Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 18, 2699-2711.
- Shiloh, Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 3, 155-168.
- Siddik, Z.H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22, 7265-7279.
- Smith, E.R., Allis, C.D., and Lucchesi, J.C. (2001). Linking global histone acetylation to the transcription enhancement of X-chromosomal genes in *Drosophila* males. *The Journal of biological chemistry* 276, 31483-31486.
- Smith, E.R., Cayrou, C., Huang, R., Lane, W.S., Cote, J., and Lucchesi, J.C. (2005). A human protein complex homologous to the *Drosophila* MSL complex is responsible for the majority of histone H4 acetylation at lysine 16. *Molecular and cellular biology* 25, 9175-9188.
- Smith, M.A., Rottkamp, C.A., Nunomura, A., Raina, A.K., and Perry, G. (2000). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1502, 139-144.
- Songyang, Z., Blechner, S., Hoagland, N., Hoekstra, M.F., Pwnica-Worms, H., and Cantley, L.C. (1994). Use of an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases. *Curr Biol* 4, 973-982.
- Songyang, Z., Lu, K.P., Kwon, Y.T., Tsai, L.H., Filhol, O., Cochet, C., Brickey, D.A., Soderling, T.R., Bartleson, C., Graves, D.J., *et al.* (1996). A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Molecular and cellular biology* 16, 6486-6493.
- Sotillo, R., Dubus, P., Martin, J., de la Cueva, E., Ortega, S., Malumbres, M., and Barbacid, M. (2001). Wide spectrum of tumors in knock-in mice carrying a Cdk4 protein insensitive to INK4 inhibitors. *The EMBO journal* 20, 6637-6647.
- Staal, A., Enserink, J.M., Stein, J.L., Stein, G.S., and van Wijnen, A.J. (2000). Molecular characterization of celtix-1, a bromodomain protein interacting with the transcription factor interferon regulatory factor 2. *Journal of cellular physiology* 185, 269-279.
- Stevens, C., and La Thangue, N.B. (2004). The emerging role of E2F-1 in the ADN damage response and checkpoint control. *ADN repair* 3, 1071-1079.
- Stucki, M., and Jackson, S.P. (2006). gammaH2AX and MDC1: anchoring the ADN-damage-response machinery to broken chromosomes. *ADN repair* 5, 534-543.
- Suh, S.W., Jensen, K.B., Jensen, M.S., Silva, D.S., Kessler, P.J., Danscher, G., and Frederickson, C.J. (2000). Histochemically-reactive zinc in amyloid plaques, angiopathy, and degenerating neurons of Alzheimer's diseased brains. *Brain Res* 852, 274-278.
- Sung, P., and Klein, H. (2006). Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nature reviews* 7, 739-750.
- Suter, B., Pogoutse, O., Guo, X., Krogan, N., Lewis, P., Greenblatt, J.F., Rine, J., and Emili, A. (2007). Association with the origin recognition complex suggests a novel role for histone acetyltransferase Hat1p/Hat2p. *BMC biology* 5, 38.

- Sykes, S.M., Mellert, H.S., Holbert, M.A., Li, K., Marmorstein, R., Lane, W.S., and McMahon, S.B. (2006). Acetylation of the p53 ADN-binding domain regulates apoptosis induction. *Molecular cell* 24, 841-851.
- Sykes, S.M., Stanek, T.J., Frank, A., Murphy, M.E., and McMahon, S.B. (2009). Acetylation of the ADN binding domain regulates transcription-independent apoptosis by p53. *The Journal of biological chemistry* 284, 20197-20205.
- Tada, S., Li, A., Maiorano, D., Mechali, M., and Blow, J.J. (2001). Repression of origin assembly in metaphase depends on inhibition of RLF-B/Cdt1 by geminin. *Nature cell biology* 3, 107-113.
- Talasz, H., Helliger, W., Puschendorf, B., and Lindner, H. (1996). In vivo phosphorylation of histone H1 variants during the cell cycle. *Biochemistry* 35, 1761-1767.
- Tamagno, E., Bardini, P., Guglielmotto, M., Danni, O., and Tabaton, M. (2006). The various aggregation states of beta-amyloid 1-42 mediate different effects on oxidative stress, neurodegeneration, and BACE-1 expression. *Free radical biology & medicine* 41, 202-212.
- Tavera-Mendoza, L., Wang, T.T., Lallemand, B., Zhang, R., Nagai, Y., Bourdeau, V., Ramirez-Calderon, M., Desbarats, J., Mader, S., and White, J.H. (2006a). Convergence of vitamin D and retinoic acid signalling at a common hormone response element. *EMBO Rep* 7, 180-185.
- Tavera-Mendoza, L.E., Wang, T.T., and White, J.H. (2006b). p19INK4D and cell death. *Cell Cycle* 5, 596-598.
- Thompson, C.M., Markesbery, W.R., Ehmann, W.D., Mao, Y.X., and Vance, D.E. (1988). Regional brain trace-element studies in Alzheimer's disease. *Neurotoxicology* 9, 1-7.
- Thullberg, M., Bartek, J., and Lukas, J. (2000). Ubiquitin/proteasome-mediated degradation of p19INK4d determines its periodic expression during the cell cycle. *Oncogene* 19, 2870-2876.
- Toledo, F., and Wahl, G.M. (2006). Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* 6, 909-923.
- Tornaletti, S., and Hanawalt, P.C. (1999). Effect of ADN lesions on transcription elongation. *Biochimie* 81, 139-146.
- Trimarchi, J.M., and Lees, J.A. (2002). Sibling rivalry in the E2F family. *Nature reviews* 3, 11-20.
- Tsai, L.H., Delalle, I., Caviness, V.S., Jr., Chae, T., and Harlow, E. (1994). p35 is a neural-specific regulatory subunit of cyclin-dependent kinase 5. *Nature* 371, 419-423.
- Tyrrell, R.M. (1994). The molecular and cellular pathology of solar ultraviolet radiation. *Mol Aspects Med* 15, 1-77.
- Utle, R.T., Lacoste, N., Jobin-Robitaille, O., Allard, S., and Cote, J. (2005). Regulation of NuA4 histone acetyltransferase activity in transcription and ADN repair by phosphorylation of histone H4. *Molecular and cellular biology* 25, 8179-8190.
- Vaughan, P.S., Aziz, F., van Wijnen, A.J., Wu, S., Harada, H., Taniguchi, T., Soprano, K.J., Stein, J.L., and Stein, G.S. (1995). Activation of a cell-cycle-regulated histone gene by the oncogenic transcription factor IRF-2. *Nature* 377, 362-365.
- Vaughan, P.S., van der Meijden, C.M., Aziz, F., Harada, H., Taniguchi, T., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., and Stein, G.S. (1998). Cell cycle regulation of histone H4 gene transcription requires the oncogenic factor IRF-2. *The Journal of biological chemistry* 273, 194-199.

- Weinberg, R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-330.
- Wohlbold, L., and Fisher, R.P. (2009). Behind the wheel and under the hood: functions of cyclin-dependent kinases in response to ADN damage. *ADN repair* 8, 1018-1024.
- Wohlschlegel, J.A., Dwyer, B.T., Dhar, S.K., Cvetic, C., Walter, J.C., and Dutta, A. (2000). Inhibition of eukaryotic ADN replication by geminin binding to Cdt1. *Science* 290, 2309-2312.
- Wu, K., Chen, A., and Pan, Z.Q. (2000). Conjugation of Nedd8 to CUL1 enhances the ability of the ROC1-CUL1 complex to promote ubiquitin polymerization. *The Journal of biological chemistry* 275, 32317-32324.
- Wurtele, H., and Verreault, A. (2006). Histone post-translational modifications and the response to ADN double-strand breaks. *Current opinion in cell biology* 18, 137-144.
- Yata, K., and Esashi, F. (2009). Dual role of CDKs in ADN repair: to be, or not to be. *ADN repair* 8, 6-18.
- Yogosawa, S., Makino, Y., Yoshida, T., Kishimoto, T., Muramatsu, M., and Tamura, T. (1996). Molecular cloning of a novel 120-kDa TBP-interacting protein. *Biochemical and biophysical research communications* 229, 612-617.
- You, Z., Chahwan, C., Bailis, J., Hunter, T., and Russell, P. (2005). ATM activation and its recruitment to damaged ADN require binding to the C terminus of Nbs1. *Molecular and cellular biology* 25, 5363-5379.
- Zhang, L., Levi, E., Majumder, P., Yu, Y., Aboukameel, A., Du, J., Xu, H., Mohammad, R., Hatfield, J.S., Wali, A., *et al.* (2007). Transactivator of transcription-tagged cell cycle and apoptosis regulatory protein-1 peptides suppress the growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Molecular cancer therapeutics* 6, 1661-1672.
- Zheng, J., Yang, X., Harrell, J.M., Ryzhikov, S., Shim, E.H., Lykke-Andersen, K., Wei, N., Sun, H., Kobayashi, R., and Zhang, H. (2002a). CAND1 binds to unneddylated CUL1 and regulates the formation of SCF ubiquitin E3 ligase complex. *Molecular cell* 10, 1519-1526.
- Zheng, N., Schulman, B.A., Song, L., Miller, J.J., Jeffrey, P.D., Wang, P., Chu, C., Koepf, D.M., Elledge, S.J., Pagano, M., *et al.* (2002b). Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F box Skp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* 416, 703-709.
- Zhou, B.B., and Elledge, S.J. (2000). The ADN damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408, 433-439.
- Zhou, J., Ma, J., Zhang, B.C., Li, X.L., Shen, S.R., Zhu, S.G., Xiong, W., Liu, H.Y., Huang, H., Zhou, M., *et al.* (2004). BRD7, a novel bromodomain gene, inhibits G1-S progression by transcriptionally regulating some important molecules involved in ras/MEK/ERK and Rb/E2F pathways. *Journal of cellular physiology* 200, 89-98.
- Zhu, Q., and Wani, A.A. Histone modifications: crucial elements for damage response and chromatin restoration. *Journal of cellular physiology* 223, 283-288.
- Zindy, F., den Besten, W., Chen, B., Rehg, J.E., Latres, E., Barbacid, M., Pollard, J.W., Sherr, C.J., Cohen, P.E., and Roussel, M.F. (2001). Control of spermatogenesis in mice by the cyclin D-dependent kinase inhibitors p18(Ink4c) and p19(Ink4d). *Molecular and cellular biology* 21, 3244-3255.
- Zindy, F., van Deursen, J., Grosveld, G., Sherr, C.J., and Roussel, M.F. (2000). INK4d-deficient mice are fertile despite testicular atrophy. *Molecular and cellular biology* 20, 372-378.

