

Caracterización de complejos CDK-Ciclina atípicos humanos

Eva Quandt Herrera

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Caracterización de complejos CDK-Ciclina atípicos humanos

Eva Quandt Herrera
Tesis Doctoral 2017



UNIVERSITAT INTERNACIONAL DE CATALUNYA
FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD

**CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS
CDK-CICLINA ATÍPICOS HUMANOS**

Eva Quandt Herrera
2017



CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS CDK-CICLINA ATÍPICOS HUMANOS

Eva Quandt Herrera

Memoria presentada para optar al título de doctor por la
Universitat Internacional de Catalunya,
Barcelona 2017

Trabajo dirigido por el Dr. Josep Clotet Erra del Departamento de
Ciencias Básicas de la Universitat Internacional de Catalunya

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud de la
Universitat Internacional de Catalunya

Dr. Josep Clotet Erra
Director de tesis

Eva Quandt Herrera
Doctoranda

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE	1
INTRODUCCIÓN	1
1. EL CICLO CELULAR	3
1.1 VISIÓN GENERAL DEL CICLO CELULAR.....	3
1.2 QUINASAS DEPENDIENTES DE CICLINA	4
1.3 COMPLEJOS CDK-CICLINA DE CICLO CELULAR.....	6
2. CICLINAS Y CDKS DE TRANSCRIPCIÓN	9
3. CICLINAS Y CDKS ATÍPICAS.....	11
3.1 NUEVAS CDKs.....	12
3.2 CICLINAS ATÍPICAS	14
3.2.1 SPY1.....	15
3.2.2 CCNI, CCNG1 y CCNG2	16
3.2.3 CNTD2	19
3.2.4 CCNY.....	19
OBJETIVOS	23
MATERIALES Y MÉTODOS	27
1. CONSTRUCCIÓN DE DENDROGRAMAS Y DIAGRAMAS DE ESTRUCTURAS PROTEÍNICAS	29
2. CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS	29
3. ENSAYO DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURA	30
3.1 Transformación de levaduras	30
3.2 Mating	31
3.3 Evaluación de la capacidad de crecimiento de los clones positivos.....	31
3.4 Preparación de extractos proteínicos de levadura para WB.....	31
4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR	32
4.1 Cultivo celular y transfección.....	32
4.2 Preparación de extractos celulares	32
4.3 Preparación de extractos de cerebro de rata	33
5. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS	33
5.1 Expresión y purificación de proteínas fusionadas a GST	33
5.2 Unión covalente (<i>crosslinking</i>) de anticuerpos a esferas magnéticas	35
5.3 Ensayo de <i>trapping</i>	35
5.4 Co-Inmunoprecipitación	35
5.5 Tiofosforilación y captura de sustratos de CDK16	36
5.6 Ensayo de fosforilación <i>in vitro</i>	37
5.7 Análisis de proteínas mediante Western Blot	38
6. Análisis MS	39
RESULTADOS	41
PARTE 1	43
IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS COMPLEJOS CDK-CICLINA	43
1.1 INTERACTOMA DE CICLINAS ATÍPICAS EN CEREBRO	43
1.1.1 PURA y ERC2 interactúan con CCNG1.....	50
1.1.2 MED23 interactúa débilmente con CNTD2.....	52
1.2 IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS COMPLEJOS CDK-CICLINA MEDIANTE ENSAYO DE DOBLE-HÍBRIDO.....	54
1.2.1 Validación del complejo CDK16-SPY1	61
1.2.2 Validación del complejo CDK6-CCNI	65
1.2.3 Validación del complejo CDK16-CCNY	67

ÍNDICE

PARTE 2	69
SUSTRATOS DE LOS NUEVOS COMPLEJOS CDK-CICLINA: IDENTIFICACIÓN DE SUSTRATOS DEL COMPLEJO CDK16-CCNY EN CÉLULAS TUMORALES	69
2.1 Identificación de interactores de CCNY.....	71
2.2 Identificación de sustratos específicamente fosforilados por CDK16	73
2.3. La proteína PRC1 interacciona con CCNY y es fosforilada por CDK16.....	75
2.4 PRC1 es fosforilada por el complejo CDK16-CCNY <i>in vitro</i>	75
DISCUSIÓN.....	79
<i>NUEVOS INTERACTORES DE LAS CICLINAS ATÍPICAS</i>	82
CCNG1-PURA	82
CCNG1-ERC2.....	82
CNTD2-MED23	83
<i>NUEVOS COMPLEJOS CDK-CICLINA</i>	84
CDK6-CCNI	87
CDK16-SPY1	88
CDK16-CCNY.....	88
CONCLUSIONES.....	95
ABREVIATURAS.....	99
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
ANEXOS	119
AGRADECIMIENTOS.....	127

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. EL CICLO CELULAR

1.1 VISIÓN GENERAL DEL CICLO CELULAR

La división celular constituye un proceso altamente conservado, formado por cuatro fases secuenciales que constituyen el ciclo celular: G_1 , S, G_2 y M (Figura 1). La fase G_1 (del inglés *Gap*, hueco) es el periodo principal de crecimiento celular; la célula aumenta en tamaño y comienza la transcripción de genes implicados en el control del ciclo y la síntesis de proteínas. En la fase S (Síntesis de DNA) tiene lugar la duplicación del genoma y los primeros pasos de la formación del huso mitótico. Durante la fase G_2 (*Gap2*), en la que la célula se prepara para la división, se controla que la célula tenga el tamaño adecuado y que el DNA se haya replicado correctamente. En la fase M (Mitosis), que engloba a mitosis y citocinesis, se produce la rotura de la envoltura nuclear, la condensación de la cromatina y la segregación de los cromosomas en dos células hijas.

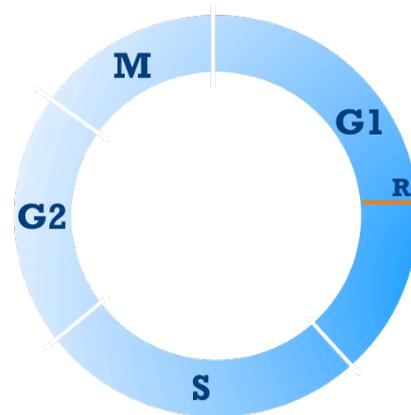


Figura 1. Ciclo celular de mamífero. Se representan las diferentes fases del ciclo celular: G_1 , S, G_2 y M. La R señala el punto de restricción, que tiene una posición relativa dentro de G_1 que dependerá del tipo celular.

Una célula recientemente formada podrá abandonar el ciclo, y permanecer quiescente en fase G_0 , si en etapas tempranas de G_1 se encuentra bajo condiciones de ausencia de señales pro-mitógenas (factores de crecimiento) y/o en presencia de señales anti-mitógenas. Más allá de este punto, llamado punto de restricción (R), la célula estará comprometida a una nueva ronda de división celular (Pardee 1974)¹. El punto de restricción suele ser considerado equivalente a el punto de control en el ciclo de levaduras denominado START

¹ Pardee definió el punto de restricción como un punto en G_1 a partir del cual la célula puede continuar el ciclo en ausencia de nutrientes, no de factores pro-mitógenos.

INTRODUCCIÓN

(L. H. Hartwell *et al.* 1971), pero este último no es sensible a factores de crecimiento, sino a la disponibilidad de nutrientes.

El ciclo celular es un proceso que debe estar regulado de una forma muy estricta para asegurar una correcta división celular. Esta regulación consiste en una serie de puntos de control (*checkpoints*) entre las diferentes fases, que inducirán la detención del ciclo en caso de que no se cumplan las condiciones adecuadas para la progresión a la siguiente fase (L. Hartwell y Weinert 1989). En procesos tumorales existe una desregulación de los mecanismos de control de la división celular. Esto hace que ésta sea una situación en la que es de vital importancia entender cómo funciona el sistema de control del ciclo celular.

1.2 QUINASAS DEPENDIENTES DE CICLINA

Los principales reguladores del ciclo celular son las proteínas quinasa dependientes de ciclina o CDKs (del inglés *Cyclin Dependent Kinases*), una familia proteínica muy conservada en la evolución. Se trata de serina/treonina-quinasas prolinea-dirigidas, que fosforilan diversos sustratos a lo largo de las diferentes fases del ciclo celular, de manera que éste avance de forma ordenada. La habilidad para fosforilar a sus sustratos, y hacerlo en el momento correcto, viene determinada por la presencia de otras proteínas: las ciclinas. Éstas constituyen las subunidades activadoras de los complejos CDK-Ciclina y confieren a las CDKs especificidad por sus sustratos. El término ciclina surge debido a que las mismas se encuentran sujetas a una regulación dependiente de ciclo, con picos en diferentes momentos del mismo.

La actividad CDK se encuentra regulada no sólo por la unión a las ciclinas, sino por otros mecanismos. Estos mecanismos incluyen fosforilaciones activadoras por parte de la CAK (quinasa activadora de CDK, del inglés *CDK-Activating Kinase*), fosforilaciones inhibitoras y unión a CKIs (inhibidores de CDK, del inglés *CDK Inhibitors*) (Marcos Malumbres y Barbacid 2005).

Las CDKs fueron descubiertas mediante *screenings* genéticos y bioquímicos en los organismos modelo *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces cerevisiae* al estudiar mutantes con defectos en el ciclo celular (L. H. Hartwell *et al.* 1971; Nurse y Bissett 1981). *S. cerevisiae* posee seis CDKs, que se pueden dividir en dos grupos: aquellas implicadas en la regulación del ciclo celular y aquellas implicadas en la transcripción (J.

Liu y Kipreos 2000). Cdc28 y Pho85, las reguladoras del ciclo, se asocian con múltiples ciclinas para llevar a cabo esta función, aunque sólo Cdc28 es esencial (Morgan 1997). Las fluctuaciones en los niveles de ciclinas permiten la unión secuencial de las mismas a Cdc28, haciendo que sea posible la regulación de procesos tan diversos por parte de una sola CDK.

En mamíferos, las CDKs responsables de dirigir el ciclo celular son CDK1, CDK2, CDK4 y CDK6 (revisión en Satyanarayana y Kaldis 2009). Estas proteínas intervienen de forma secuencial en el ciclo celular para permitir la progresión a través de las diferentes fases (Figura 2). Al igual que en *S. cerevisiae*, para la correcta progresión del ciclo celular tan solo es esencial la equivalente a Cdc28 en mamíferos, CDK1 (Santamaría *et al.* 2007).

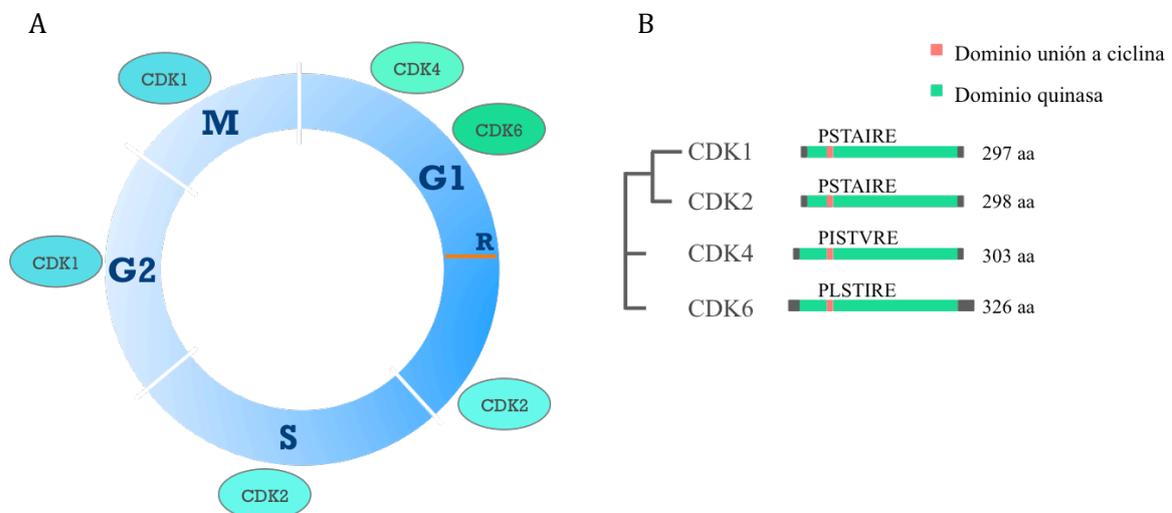


Figura 2. Ciclo celular y CDKs de ciclo de mamífero. A) Fases del ciclo celular y las CDKs que intervienen en cada una de ellas. B) Estructura básica de las principales CDKs de ciclo celular. Se indica la secuencia de aminoácidos correspondiente a al dominio de unión a ciclinas así como el número de aminoácidos (aa) de cada CDK. El dendrograma se hizo mediante herramienta MUSCLE (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle) a partir de las secuencias de aminoácidos correspondientes a los dominios quinasa de las CDKs. El esquema de las estructuras se hizo a escala; las posiciones de los diferentes dominios representados son las que figuran en la base de datos Pfam (www.pfam.xfam.org; ver Materiales y Métodos)

1.3 COMPLEJOS CDK-CICLINA DE CICLO CELULAR

A lo largo del ciclo celular de mamíferos se van formando diferentes complejos, constituidos por varias CDKs y distintas ciclinas (Figura 3). Dichos complejos son los considerados canónicos, con una participación directa en el control del ciclo celular (Hydbring, Malumbres, y Sicinski 2016). Otros complejos CDK-Ciclina, con funciones no canónicas, tienen funciones fuera del control directo del ciclo celular, tal y como se verá más adelante.

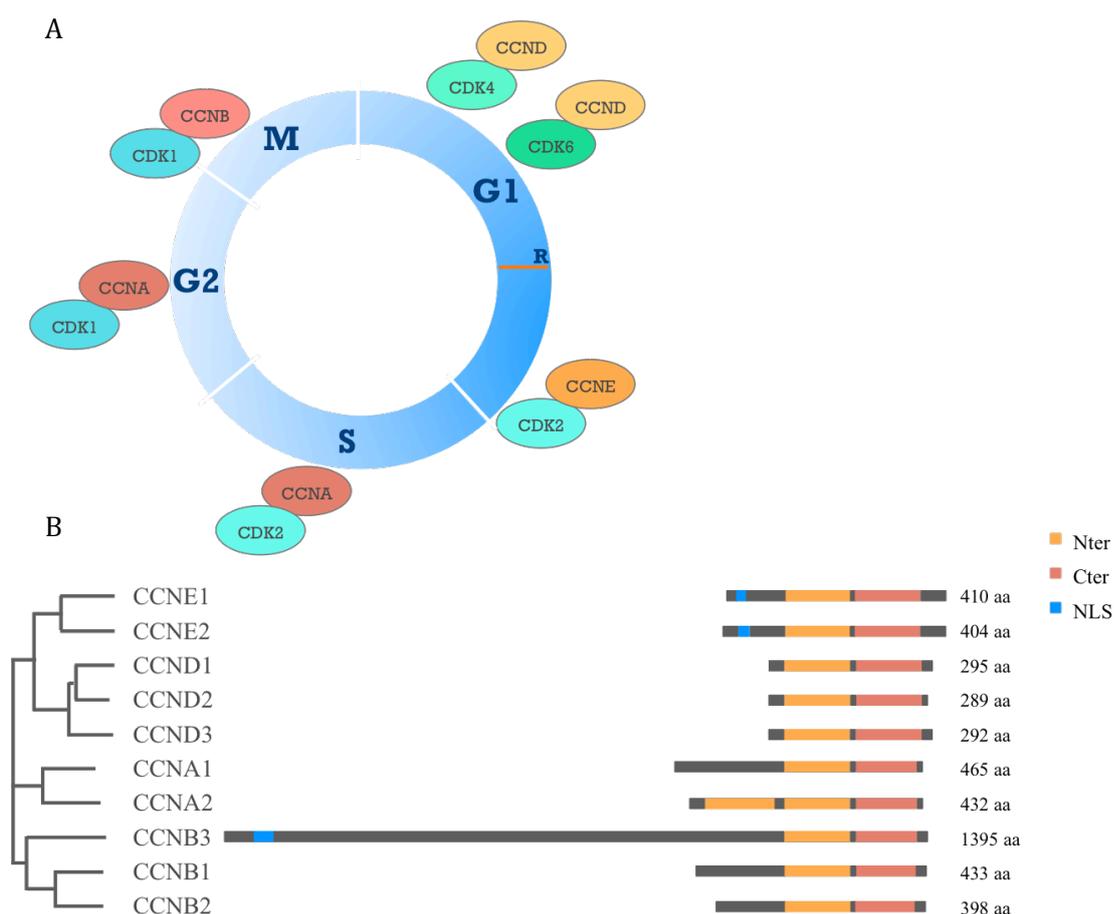


Figura 3. Complejos CDK-Ciclina de ciclo celular y estructura básica de las ciclinas canónicas.

A) Diferentes complejos de CDK-Ciclina intervienen en diferentes fases del ciclo celular. B) Estructura básica de las ciclinas canónicas. Se representan las cajas de ciclina N-terminal y C-terminal, así como secuencias de señalización nuclear (NLS) y se indica el número de aminoácidos de cada ciclina. El dendrograma se hizo partir de las secuencias completas de aminoácidos de las ciclinas; las posiciones de los diferentes dominios representados son las que figuran en la base de datos Pfam.

Al inicio de G_1 , señales pro-mitógenas promueven la asociación entre las ciclinas tipo D (CCND) y sus CDKs (CDK4 y CDK6). La activación de complejos tiene lugar a varios niveles, incluyendo la síntesis y estabilización de CCND y el transporte de los complejos al núcleo, donde fosforilan a sus sustratos. Los complejos CDK4/6-CCND promueven el avance del ciclo al iniciar la fosforilación de proteínas de la familia retinoblastoma (pRb, p107 y p130) (Sherr y Roberts 2004). Esto provoca la liberación de factores de transcripción de la familia E2F, de forma que se activa la transcripción de genes que se encuentran bajo el control de los mismos y que son requeridos para la progresión del ciclo celular. Entre ellos, de los primeros en activarse son *CCNE* y *CCNA* (Satyanarayana y Kaldis 2009). Consecuentemente, al final de G_1 se activa CDK2 gracias a su unión con CCNE. De este modo se completa la fosforilación de pRb y aumenta la actividad transcripcional mediada por E2F para permitir la entrada en fase S (Lundberg y Weinberg 1998).

Al inicio de la fase S, con la síntesis de CCNA, se produce el ensamblaje de los complejos CDK2-CCNA, necesarios para la fosforilación de proteínas necesarias para la replicación del DNA y salida de fase S (Petersen *et al.* 1999; Coverley *et al.* 2000). En G_2/M , CCNA se asocia a CDK1 para salir de G_2 e iniciar la mitosis hasta profase, a partir de la cual CCNA no es necesaria (Furuno, Elzen, y Pines 1999). Desde la transición entre G_2 y M, complejos CDK1-CCNB se encargan de conducir a las células a través M hasta su finalización, momento en el cual estos complejos deben ser degradados para una correcta salida de esta fase (Marcos Malumbres y Barbacid 2005).

A través de experimentos en que se delecionaron las diferentes CDKs de ciclo en ratones, se vio que sólo CDK1 es esencial hasta las etapas intermedias de la gestación (E12.5), debido a la existencia de mecanismos de compensación. La ausencia de las otras CDKs comportaba deficiencias en la proliferación de determinados tipos celulares (Santamaría *et-al.* 2007), lo que indica que las CDKs “no esenciales” sí tienen importancia en determinadas situaciones. Estas situaciones concretas también podrían incluir a ciertos momentos del desarrollo, a diferentes órganos, o a determinadas situaciones patológicas, como el cáncer.

INTRODUCCIÓN

Como es de esperar, un incorrecto funcionamiento de estos controladores de ciclo puede conducir a una proliferación no programada. De hecho, CDKs y ciclinas funcionan como oncogenes en diversos tipos de cáncer (M Malumbres y Barbacid 2001), motivo por el cual proteínas como CDK4 y CDK6 son diana terapéutica de gran interés (Hamilton e Infante 2016). Muchas ciclinas presentan patrones de expresión alterados en diversos tipos de tumor. CCND1 se encuentra sobreexpresada en NSCLC (carcinoma de células no pequeñas de pulmón, del inglés *Non-Small Cell Lung Carcinoma*) (Sterlacci *et al.* 2010), al igual que CCNE en tumores ováricos (Kuhn *et al.* 2016; Ayhan *et al.* 2017); por otro lado, se ha propuesto el valor pronóstico de la expresión de CCNB1 en cáncer de mama ER+ (Ding *et al.* 2014).

2. CICLINAS Y CDKs DE TRANSCRIPCIÓN

La mayoría de estudios acerca de la implicación de las ciclinas en cáncer se ha centrado en las cuatro subfamilias de proteínas (D, E, A y B) que intervienen directamente en el ciclo. Pero existen muchas otras proteínas que también contienen la secuencia conocida como “caja de ciclina” (Figura 4A). Se trata de una secuencia característica de aproximadamente 100 aminoácidos que forman cinco hélices α y que define a la familia proteínica de las ciclinas (Noble *et al.* 1997). Algunas de estas ciclinas, conocidas como ciclinas de transcripción, forman complejos con CDKs–de transcripción- (Figura 4B), y tienen funciones descritas desde hace años, sobre todo en transcripción o en la respuesta a daño al DNA (Tabla 1). Estas ciclinas, al contrario que las cuatro que regulan el ciclo celular, no tienen una expresión cíclica, y sus niveles son relativamente constantes a lo largo de todo el ciclo celular.

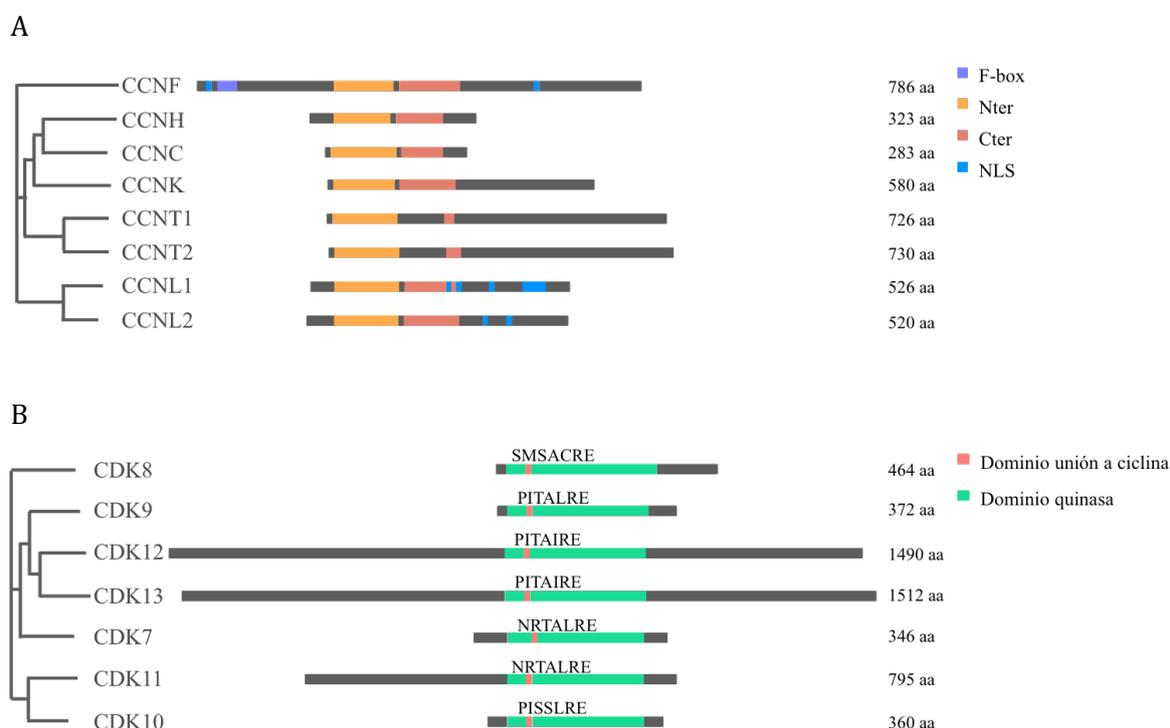


Figura 4. Estructura básica de las ciclinas (A) y CDKs (B) de transcripción. A) Se representan las cajas de ciclina N-terminal y C-terminal, así como secuencias de señalización nuclear. También se muestra la caja F (F-box) característico de la CCNF. Se indica el número de aminoácidos de cada ciclina. B) Se indica la secuencia de aminoácidos correspondiente a al dominio de unión a ciclinas así como el número de aminoácidos de cada CDK.

INTRODUCCIÓN

Otra diferencia respecto a los complejos de CDKs y ciclinas de ciclo celular es que las CDKs de transcripción no presentan el mismo grado de promiscuidad, y habitualmente una CDK se compleja solamente con una ciclina (M Malumbres 2014).

Tabla 1. Ciclinas de transcripción. Se muestran las funciones de estas ciclinas, en asociación o no con CDKs.

CICLINA	FUNCIÓN	CDK
CCNC	Transcripción por RNA pol II Vía Wnt/ β -catenina Inhibición lipogénesis	CDK8
	Reparación DNA	CDK3
CCNF	Respuesta a daño en DNA Proteólisis mediada por SCF	—
CCNH	Forma parte de la CAK Transcripción por RNA pol II	CDK7
CCNK	Transcripción por RNA pol II	CDK12 y CDK13
	Respuesta a daño en DNA	CDK9
	Respuesta a daño en DNA	CDK12
CCNL1	Procesamiento de pre-mRNA	CDK11
CCNL2	Procesamiento de pre-mRNA	CDK11
CCNT1	Transcripción por RNA pol II	CDK9
CCNT2	Transcripción por RNA pol II	CDK9

Fuente: Lim y Kaldis 2013

3. CICLINAS Y CDKs ATÍPICAS

Pero las familias de las ciclinas y las CDKs se han seguido ampliando. Principalmente a raíz del Proyecto Genoma Humano, fueron identificadas un número considerable de proteínas que poseen la característica caja de ciclina (Figura 5A). En total, la familia estaría compuesta por al menos 29 proteínas (Marcos Malumbres y Barbacid 2005). En cuanto a las CDKs, el genoma humano contiene al menos 20 genes que codifican esta familia y otros 5 una familia relacionada conocida como CDKL (*CDK like*) (Figura 5B).

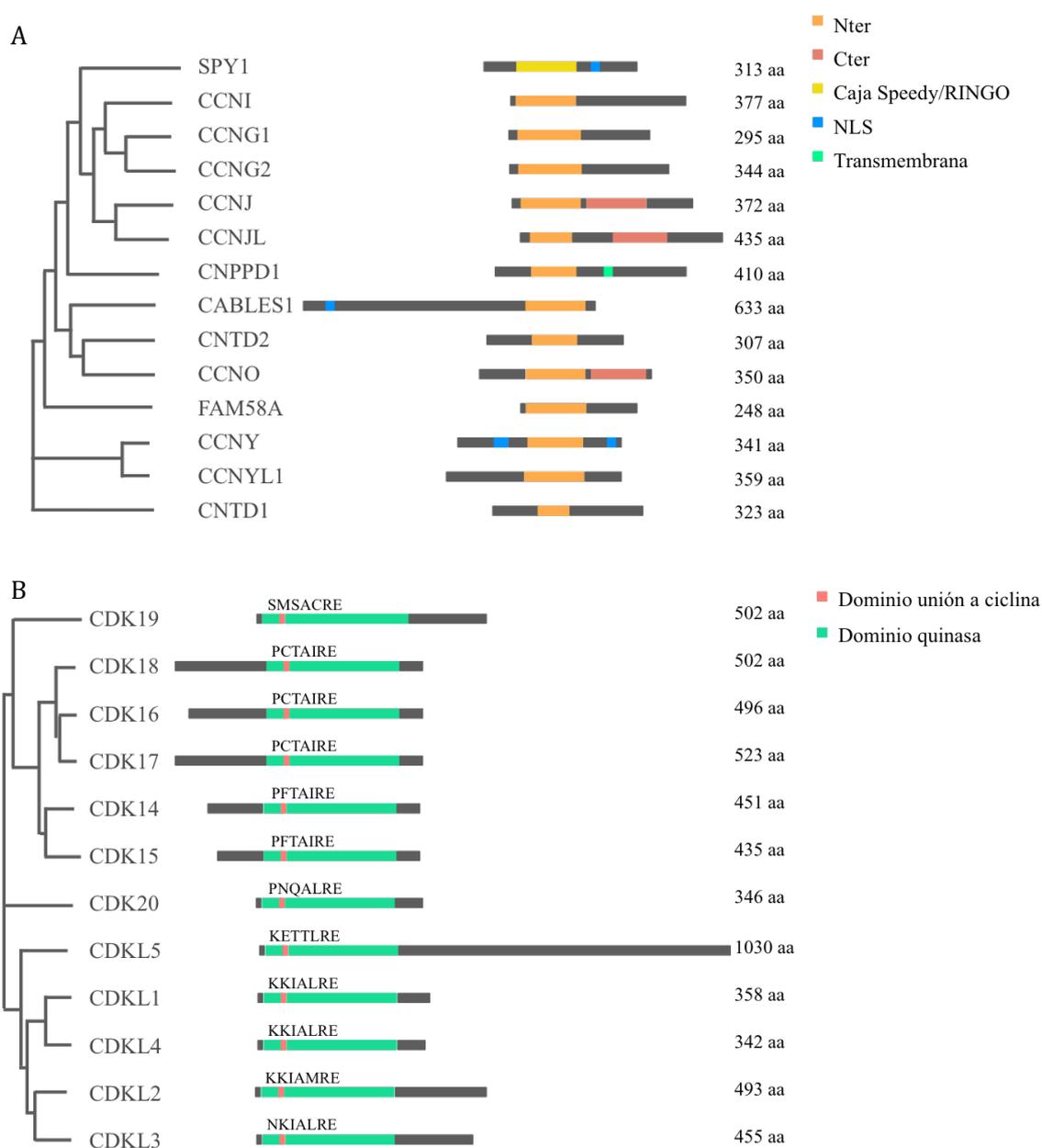


Figura 5. Estructura básica de las ciclinas atípicas (A) y las nuevas CDKs (B).

INTRODUCCIÓN

Hasta hace poco, estas nuevas CDKs y ciclinas eran conocidas también como *orphan*, ya que se desconocían sus respectivas parejas. Recientemente se han descrito algunas interacciones entre estas nuevas proteínas, por ejemplo CDK5-CCNI (Brinkkoetter *et al.* 2009) y CDK14/16-CCNY (Jiang *et al.* 2009; Mikolcevic *et al.* 2012). Es por ello que, tal y como se justificará más adelante en este trabajo, propongo denominar a estas nuevas ciclinas como “ciclinas atípicas”.

3.1 NUEVAS CDKs

A lo largo de la evolución, las CDKs han aumentado en número y en grado de especialización. Mientras que las células de *S. cerevisiae* poseen seis CDKs, el genoma de mamíferos, tal y como se acaba de comentar, codifica para al menos veinte. Este incremento del número de CDKs a lo largo de la evolución no ha sido simétrico (Tabla 2): de dos CDKs de ciclo celular en *S. cerevisiae*, pasamos a once en mamíferos, mientras que la diferencia respecto a las CDKs de transcripción es mucho menos notable (de cuatro a nueve).

Tabla 2. CDKs de ciclo y de transcripción en *S. cerevisiae* y mamíferos.

CDKs de ciclo		CDKs de transcripción	
<i>S. cerevisiae</i>	Mamíferos	<i>S. cerevisiae</i>	Mamíferos
Cdc28	CDK1	Kin28	CDK7
Pho85	CDK2	Srb10	CDK8
	CDK3	Bur1	CDK9
	CDK4	Ctk1	CDK10
	CDK5		CDK11
	CDK6		CDK12
	CDK14		CDK13
	CDK15		CDK19
	CDK16		CDK20
	CDK17		
	CDK18		

Todas las nuevas CDKs, excepto CDK19 y CDK20, son más cercanas filogenéticamente a las CDKs de ciclo celular que a las de transcripción (M Malumbres 2014). Esta cercanía a proteínas que juegan un papel tan importante en patologías como el cáncer podría ser indicativo de funciones relevantes de estas nuevas CDKs que merece la pena investigar.

Las CDKs 14 y 15, y las 16, 17 y 18 conforman dos subgrupos de CDKs, PFTAIREs y PCTAIREs respectivamente, en base a la secuencia de interacción con las ciclinas, correspondiente a la PSTAIRE de CDK1. Hasta hace unos años se consideraban CDKs *orphan*, ya que no se conocía su interacción con ninguna ciclina. Recientemente se ha descrito la interacción de miembros de las dos familias con la nueva ciclina CCNY y con SPY1, una proteína que no es considerada ciclina, pero que es capaz de interactuar con CDKs (se explica en el apartado 3.2 Nuevas Ciclinas).

CDK16 y 18 se expresan principalmente en tejidos post-mitóticos como cerebro y testículos (Besset, Rhee, y Wolgemuth 1999), mientras que CDK17 predomina sólo en cerebro (Hirose *et al.* 1997). A nivel subcelular, CDK16 localiza en el citoplasma y el nucléolo de neuronas (Le Bouffant *et al.* 1998; Charrasse *et al.* 1999), pero la fracción que interactúa con CCNY es dirigida a la membrana plasmática (Mikolcevic *et al.* 2012).

CDK16 está implicada en el crecimiento de neuritas (Graeser *et al.* 2002) y en desórdenes intelectuales (Ropers 2010); su expresión se encuentra además aumentada en tejidos derivados de tumores de mama y próstata (Yanagi *et al.* 2014) y contribuye al crecimiento tumoral (Yanagi y Matsuzawa 2015). La disminución de los niveles de CDK16 mediante siRNA induce una inhibición del crecimiento de tumores en ratones con xenoinjertos de cáncer colorrectal (Yanagi *et al.* 2016) mientras que no afecta a la proliferación de células no transformadas (Yanagi y Matsuzawa 2015). Esto la hace muy atractiva como potencial diana terapéutica, de hecho, se ha reportado que el inhibidor de quinasas rebastinib, que actualmente está en fase I de un ensayo clínico para leucemia mieloides crónica, es capaz de inhibir a CDK16 (Dixon-Clarke *et al.* 2017). Estos datos apuntan al interés que tendría el desarrollo de inhibidores específicos de esta CDK.

3.2 CICLINAS ATÍPICAS

Al igual que el resto de las ciclinas, las ciclinas atípicas contienen la caja de ciclina N-terminal, necesaria para la unión a la CDK. Sin embargo, la mayoría de las ciclinas atípicas, a excepción de CCNJ, CCNJL y CCNO, carece de la caja de ciclina C-terminal (según base de datos Pfam, Finn *et al.* 2016), que se considera requerida para el correcto plegamiento de las ciclinas. En la mayoría de los casos siguen sin conocerse las parejas, las funciones o los mecanismos reguladores de estas proteínas.

En la Tabla 3 se muestran otras características estructurales de las ciclinas atípicas así como sus posiciones en la secuencia primaria de la proteína.

Tabla 3. Características estructurales de las ciclinas atípicas.

CICLINA	DOMINIOS ¹		REGIONES		MOTIVO		ENRIQUECIMIENTO ⁵	
	TIPO	POSICIÓN (aa)	TIPO	POSICIÓN (aa)	TIPO	POSICIÓN (aa)	aa	POSICIÓN (aa)
CABLES1	Ciclina Nter	490-616			NLS ⁴	59-70	Ala	2-134
CCNG1	Ciclina Nter	17-150						
CCNG2	Ciclina Nter	21-154						
CCNI	Ciclina Nter	15-143	PEST ²	280-364				
			DDD ³	31-36				
CCNJ	Ciclina Nter	15-143						
	Ciclina Cter	145-268						
CCNJL	Ciclina Nter	14-104						
	Ciclina Cter	193-313						
CCNO	Ciclina Nter	104-229						
	Ciclina Cter	231-344						
CCNY	Ciclina Nter	134-265			NLS ⁴	76-103 317-335		
					Señal miristoilación ⁵	2		
CCNYL1	Ciclina Nter	163-285			Señal miristoilación ⁵	2		
CNPPD1	Ciclina	72-174			Transmembrana ⁵	233-253		
CNTD1	Ciclina Nter	109-178						
CNTD2	Ciclina Nter	95-204						
FAM58A	Ciclina Nter	15-137					Gly	6-10
SPY1	RINGO box	68-200			NLS ⁴	228-240		

Fuentes: ¹Base de datos Pfam (www.pfam.xfam.org), ²Nakamura *et al.* 1995, ³Hernández-Ortega *et al.* 2013, ⁴Predictor NucPred (www.sbc.su.se/~maccallr/nucpred/; Brameier *et al.* 2007), ⁵UniProt (www.uniprot.org).

A pesar del poco conocimiento que se tiene de las ciclinas atípicas, diversos estudios las han relacionado con diferentes patologías, incluyendo ciertos tipos de cáncer (Franke *et al.* 2008; Wallmeier *et al.* 2014; R. Li *et al.* 2015; Zi *et al.* 2015; Haiyuan Liu *et al.* 2016), motivo que las hace interesantes para su estudio.

3.2.1 SPY1

Las CDKs también pueden ser activadas por proteínas que no son consideradas ciclinas. Un ejemplo es la familia de proteínas SPY/SPEEDY/RINGO (Lenormand 1999; Ferby *et al.* 1999). Dicha familia carece de la caja de ciclina típica de las ciclinas, pero son capaces de interactuar con CDKs a través de una secuencia denominada “caja RINGO” (Cheng, Xiong, *et al.* 2005; Dinarina *et al.* 2005). Del mismo modo que muchas ciclinas, SPY1 se expresa cíclicamente; a su vez, su degradación a través del proteasoma, mediada por ubiquitinación, también tiene lugar de forma cíclica (Dinarina, Santamaria y Nebreda 2009; Lenormand 1999; Gutierrez *et al.* 2006)

Presenta la particularidad de que es capaz de unirse tanto a CDKs de la transición G₁/S (CDK2) como de la G₂/M (CDK1); además, la activación de estas CDKs mediada por SPY1 promueve la fosforilación de sustratos no canónicos (Karaïskou *et al.* 2001; Cheng, Gerry, *et al.* 2005). El complejo CDK1-SPY1 promueve la transición G₂/M, y favorece el mantenimiento de elevados niveles de actividad CDK1 en mitosis (Dinarina 2009) y tiene un papel esencial en meiosis (Gutierrez *et al.* 2006; Mikolcevic *et al.* 2016). En complejo con CDK2, SPY1 juega un papel importante en la entrada en fase S en células en cultivo. De hecho, su sobreexpresión acelera la entrada en esta fase, así como la proliferación celular. Por otra lado, la inhibición de su expresión provoca un retraso en la entrada en S (Porter *et al.* 2002; Porter, Kong-Beltran, y Donoghue 2003). Esta promoción de la progresión del ciclo celular se da incluso en células senescentes o frente a estimulación pro-apoptótica (Barnes *et al.* 2003; Gastwirt *et al.* 2006). Estos efectos parecen dependientes de la actividad CDK, ya que mediante el uso de formas inactivas de CDK1 y CDK2 desaparecen los efectos que SPY1 tiene en las transiciones del ciclo celular (Cheng *et al.* 2005). A día de hoy, no se ha reportado la interacción de SPY1 con CDK4 o CDK6, pero sí es capaz de activar a CDK5 (Dinarina *et al.* 2005; Nebreda 2006). La interacción de SPY1 con CDK16 también ha sido detectada en un *screening* mediante un ensayo de doble híbrido en levaduras (Y2H, del inglés *Yeast 2 Hybrid*) (Mikolcevic *et al.* 2012).

INTRODUCCIÓN

La activación de CDK1 y CDK2 por parte SPY1, al contrario de lo que sucede para otras ciclinas, no requiere fosforilación activadora por parte de la CAK y los complejos que forman son menos sensibles a inhibidores de CDKs como p21 y Myt1. Además, en un fenómeno no conocido para ninguna ciclina, SPY1 es capaz de unirse y promover la degradación de p27 (McAndrew *et al.* 2007). Todo esto sugiere que SPY1 podría ser capaz de formar complejos activos en condiciones en que los complejos CDK-ciclina no lo son (Karaiskou *et al.* 2001).

SPY1 se expresa en muchos tejidos y líneas celulares (Porter *et al.* 2002; Cheng, Xiong, *et al.* 2005), y esta expresión se encuentra aumentada en diversos tipos de tumor, como por ejemplo de mama, hepático y de cerebro (Barnes *et al.* 2003; Zucchi *et al.* 2004; Ke *et al.* 2009; D Lubanska y Porter 2014; Dorota Lubanska *et al.* 2014). De hecho, su sobreexpresión en células de mama promueve la tumorigénesis y la resistencia a tamoxifeno a través de la activación de ERK1/2 (Golipour *et al.* 2008; Ferraiuolo *et al.* 2017).

3.2.2 CCNI, CCNG1 y CCNG2

De especial interés para nuestro grupo de investigación es la familia de las ciclinas tipo PCL (de *Pho85 CycLin*). Se trata de un conjunto de ciclinas que, en *S. cerevisiae*, interaccionan con la CDK Pho85 para dirigir el ciclo celular a través de G₁. Sin embargo, tal y como se ha explicado previamente, la principal CDK responsable de esta función es Cdc28, en asociación con las ciclinas tipo CLN, que por sí sola es capaz de llevar a cabo las funciones esenciales en el control del ciclo celular. A pesar de ello, Pho85 no debería considerarse una CDK redundante, ya que ésta parece ejercer sus funciones reguladoras ante condiciones diferentes a aquellas en que predomina Cdc28 (Moffat y Andrews 2004; Hernández-Ortega *et al.* 2013).

Según la base de datos del NCBI HomoloGene, Pcl1 no tiene un homólogo en mamíferos. Sin embargo, si se realiza un alineamiento de Pcl1 y CCNI (Figura 6), se pueden apreciar las similitudes en su estructura: ambas poseen el DDD (*Dma1 Docking Domain*) descrito por Hernández-Ortega y una caja de ciclina N-terminal en posiciones equivalentes. El DDD consiste en una secuencia de desestabilización a través de la cual Pcl1 es

ubiquitinada para su degradación (Hernández-Ortega *et al.* 2013). También se ha postulado la presencia de una secuencia de desestabilización PEST en CCNI (Nakamura *et al.* 1995), pero lo cierto es que la misma no es prototípica y está ausente en Pcl1. De hecho, CCNI es degradada por el proteasoma tras ser ubiquitinada, pero si se deleciona la dicha secuencia, CCNI sigue presentando el mismo grado de ubiquitinación (Nagano *et al.* 2013), lo que sugiere que tal vez esta secuencia PEST no es funcional y que el dominio DDD es el realmente implicado en la regulación de los niveles de CCNI.

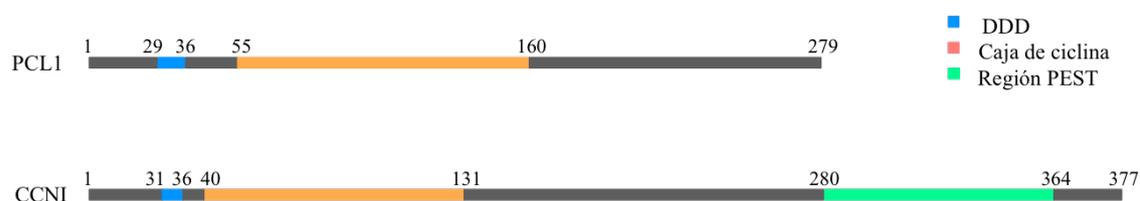


Figura 6. Características de las ciclinas tipo PCL. Alineamiento de las estructuras básicas de Pcl1 y CCNI en que se señalan los principales dominios estructurales y la secuencia PEST propuesta en Nakamura *et al.* 1995.

Por otro lado, CDK5 aparece como la homóloga en mamíferos de Pho85. Dado que la pareja descrita de CDK5 hasta el momento es CCNI, se podría pensar en la existencia de un paralelismo entre estos dos complejos.

CCNI activa a CDK5 y la retiene en el núcleo, en contraste a p35 (otro activador de CDK5 no ciclina), que parece retenerla en la membrana plasmática (Saito *et al.* 2007; Hagmann *et al.* 2015). El complejo CDK5-CCNI disminuye la apoptosis en células diferenciadas (Brinkkoetter *et al.* 2009; Weishaupt, Neusch, y Bähr 2003).

CCNI se expresa mayoritariamente en tejidos post-mitóticos y sus niveles de mRNA no fluctúan a lo largo del ciclo celular (Nakamura *et al.* 1995). Por estos motivos, se ha considerado que CCNI no juega un papel en la regulación de la proliferación. Pero lo cierto es que los niveles de proteína sí oscilan a lo largo del ciclo, presentando un pico en fase S. De hecho, células con CCNI delecionada se acumulan en G₂/M y disminuyen su proliferación (Nagano *et al.* 2013).

Los niveles de CCNI se encuentran aumentados en cáncer de ovario y tumores invasivos de mama y se ha visto que este aumento en su expresión correlaciona con la actividad

INTRODUCCIÓN

proliferativa y angiogénica (Cybulski *et al.* 2012; Landberg *et al.* 2005). Además, promueve resistencia al fármaco cisplatina en cáncer cervical (R. Li *et al.* 2015).

Por similitud de secuencias, CCNI y las también atípicas CCNG1 y CCNG2 forman un subgrupo dentro de la familia de las ciclinas (ver Figura 5).

CCNG1, cuya expresión es activada transcripcionalmente por p53 (Ohtsuka *et al.* 2003), tiene unos niveles máximos de expresión entre las fases G₂ y M (Seo *et al.* 2006). Es capaz de interactuar con CDK1, CDK2, CDK4, CDK5 y CDK6 (Piscopo y Hinds 2008), pero el significado fisiológico de estas interacciones no está claro, ya que los complejos no muestran actividad *in vitro*. El hecho de que la caja de ciclina de CCNG1 intervenga en su degradación por ubiquitinación, podría hacer pensar que la interacción con las CDKs regula la estabilidad de la ciclina.

Acerca de CCNG1 se han reportado tanto efectos positivos como negativos en la proliferación celular. Se encuentra sobreexpresada en diversos tipos de cáncer como tumores hepáticos (Jensen *et al.* 2003), donde promueve la transición epitelio-mesenquimal y facilita la metástasis (Wen *et al.* 2012) y aumenta la proliferación al expresarse de forma ectópica (Smith *et al.* 1997). Ratones deficientes en CCNG1 desarrollan menos tumores, y éstos son de menor tamaño y malignidad (Jensen *et al.* 2003). También se ha demostrado la implicación de CCNG1 en la expansión de TICs (células iniciadoras de tumor, del inglés *Tumor Initiating Cells*) de hepatoma mediante inducción del factor de transcripción SOX2, implicado en el desarrollo de células madre de cáncer (Wen *et al.* 2013).

Por otro lado, CCNG1 parece funcionar como regulador negativo de la proliferación en otros contextos, por ejemplo en células tumorales de endometrio (F. Liu *et al.* 2013). Se ha reportado su implicación en apoptosis y en la regulación de *checkpoints*, lo cual guardaría relación con el hecho de que sea diana transcripcional de p53 ante daño en DNA (Russell *et al.* 2012). Además, CCNG1 interactúa con PP2A, que es regulador negativo del crecimiento celular (Okamoto *et al.* 2002) y con una quinasa no CDK, la GAK (Quinasa asociada a ciclina G, del inglés *cyclin G Associated Kinase*), que está implicada en la señalización por receptores del factor de crecimiento epidérmico EGFR (Kanaoka *et al.* 1997; Zhang, Gjoerup, y Roberts 2004).

En el caso de CCNG2, parece claro su papel como inhibidor de la progresión del ciclo celular. Interacciona con la mencionada fosfatasa PP2A, disminuyendo la fosforilación de CDK2 y provocando citocinesis aberrantes (Bennin *et al.* 2002). Su expresión se encuentra aumentada en células en proceso apoptótico (Horne *et al.* 1996; Horne *et al.* 1997), y disminuida en diversos tipos de tumor. Esta baja expresión correlaciona con una mayor progresión tumoral y un pronóstico desfavorable (Xiao *et al.* 2015; G. G. Sun *et al.* 2014).

3.2.3 CNTD2

CNTD2 es una ciclina para la que prácticamente no se dispone de información publicada. Existen datos acerca de los niveles de expresión procedentes de análisis masivos en diversas bases de datos y también se ha asociado a una metilación diferencial de DNA ante la exposición a nicotina en pulmón fetal (Chhabra *et al.* 2014).

3.2.4 CCNY

CCNY, una ciclina ampliamente expresada, constituye la ciclina más conservada en metazoos, a excepción de CCNC, incluso en regiones externas a la caja de ciclina (D. Liu y Finley 2010), lo que sugiere que tiene una función relevante. Tiene un perfil cíclico de expresión, con un pico en la transición G₂/M (Davidson *et al.* 2009). Del mismo modo que la pareja CDK16-SPY1, CCNY fue identificada como interactor de CDK14 y CDK16 a través de ensayos de Y2H (Jiang *et al.* 2009; Mikolcevic *et al.* 2012).

Una característica de CCNY, ausente en el resto de ciclinas, es la presencia de una señal de miristoilación en su extremo N-terminal. Esta señal, consistente en la presencia de una glicina en la posición 2 de la cadena polipeptídica, dirige a la proteína a la membrana plasmática. Así, CCNY será capaz de reclutar a sus CDKs a la membrana.

La activación de CDK16 por parte de CCNY no requiere de fosforilación previa por parte de la CAK. Sin embargo, sí se ha sugerido la necesidad de que CCNY interactúe con una proteína 14-3-3 antes de poder activar a CDK16 (Shehata *et al.* 2015).

INTRODUCCIÓN

CCNY está implicada en procesos fisiológicos como la espermatogénesis (Mikolcevic *et al.* 2012), la adipogénesis (An *et al.* 2015) o la formación y destrucción de sinapsis en neuronas post-mitóticas (Ou *et al.* 2010; Park *et al.* 2011). También tiene un papel esencial en el mantenimiento de la capacidad de auto-renovación y regeneración de células madre de mama (Zeng *et al.* 2016). A su vez, CCNY se ha visto implicada en diversos tipos de cáncer, entre ellos, glioma y carcinoma hepatocelular (Xu *et al.* 2009; T. Sun *et al.* 2014).

Gran parte de los efectos de CCNY se deben a su implicación en la vía de Wnt/ β -catenina (Davidson *et al.* 2009). Durante la mitosis, CCNY recluta a CDK14 a la membrana plasmática, donde fosforila a LRP6 (receptor de ligandos Wnt) activando así esta vía de señalización. Esto implica que en ausencia de ligandos Wnt, la activación de la vía está mediada por el complejo CDK14-CCNY, y que está, por tanto, bajo el control del ciclo celular. A su vez, la señalización Wnt también está implicada en el control del ciclo, ya que promueve la progresión a través de la fase G1 por inducción de la transcripción de CCND1. De esta forma, se genera un bucle de retroalimentación que podría estar promoviendo la sincronía de los diferentes eventos del ciclo celular. Ha sido sugerida la existencia de cierto grado de redundancia entre CCNY y su paróloga CCNYL1 en la activación de Wnt, lo que podría apuntar a la importancia que la regulación de esta vía tiene (Zeng *et al.* 2016). Tanto CCNY como CCNYL1 tienen dos isoformas, una de las cuales se encuentra miristoilada y otra no. Parece que la CCNY no miristoilada localiza principalmente en núcleo (X. Li *et al.* 2009) lo que podría apuntar a funciones de CCNY en el mismo.

Tal y como se ha mencionado, es poca la información existente acerca de las ciclinas atípicas. La mayoría de los datos disponibles proceden de estudios masivos y la información se encuentra muy dispersa. En los anexos de este trabajo se pueden encontrar una serie de tablas que recopilan la información disponible en diferentes bases de datos acerca de las ciclinas atípicas que son objeto de estudio en este trabajo.

OBJETIVOS

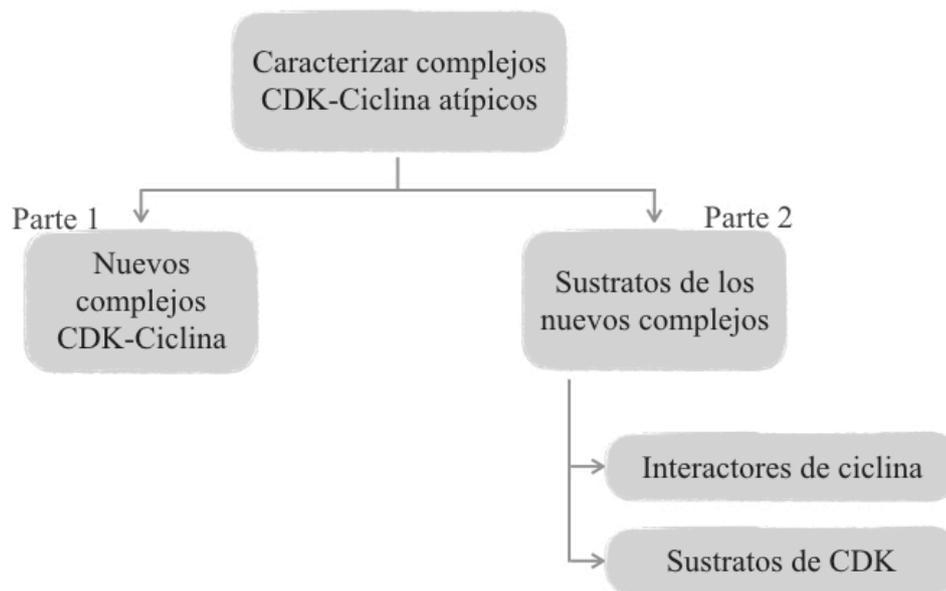
OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar complejos CDK-Ciclina atípicos

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar nuevos complejos CDK-Ciclina implicados en la regulación del ciclo celular
2. Identificar sustratos de los nuevos complejos CDK-Ciclina



MATERIALES Y MÉTODOS

1. CONSTRUCCIÓN DE DENDROGRAMAS Y DIAGRAMAS DE ESTRUCTURAS PROTEÍNICAS

Los dendrogramas de las CDKs y las ciclinas se confeccionaron mediante el uso de la herramienta MUSCLE (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle) usando los parámetros predeterminados. En el caso de las CDKs, se tuvieron en cuenta los dominios quinasa, mientras que para las ciclinas se utilizó la secuencia completa.

Los diagramas de las estructuras están hechos a escala, y las posiciones de las diferentes estructuras que se señalan proceden de diversas fuentes:

- Dominios quinasa de CDKs, dominios transmembrana: UniProt (www.uniprot.org)
- Dominio de unión a ciclina: Manning 2002
- Cajas de ciclina, cajas F-box, cajas RINGO: Pfam (www.pfam.xfam.org)
- Secuencias de señalización nuclear (NLS): www.sbc.su.se/maccallr/nucpred; Brameier *et al.* 2007

2. CONSTRUCCIONES PLASMÍDICAS

Las diferentes construcciones empleadas en este trabajo se obtuvieron mediante clonación por recombinación mediante el kit In-Fusion HD (Clontech, 639649) según las instrucciones del fabricante.

Las diferentes ciclinas y CDKs fueron clonadas en los vectores pGBKT7 y pGADT, respectivamente, incluidos en el kit *Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System* (Clontech, 630489). Los vectores control pGBKT7-Lam, pGBKT7-p53 y pGADT7-AgT están incluidos en dicho kit. CNTD2 fue adquirido como un *gBlock* (IDT) basado en la secuencia de Ensemble ENST00000430325.6. El resto de insertos se amplificaron a partir de cDNA obtenido de diferentes líneas celulares mediante un kit comercial (Bio-Rad, 1708890).

MATERIALES Y MÉTODOS

Las proteínas de fusión a GST se obtuvieron por clonación de las mismas en el vector pGEX6P1. En este vector de expresión bacteriana, las proteínas se producen fusionadas a un GST N-terminal. Para la generación de la PRC1 no fosforilable, pGEX6P1-PRC1(T481A), y de la CDK16 análogo-sensitiva (AS), pGEX6P1-CDK16(F240G), se llevó a cabo una mutagénesis dirigida, en la que se utilizan unos oligonucleótidos que contienen el cambio puntual deseado y que al incluirse en la mezcla de PCR, introducen la modificación nucleotídica necesaria para generar la mutación.

Para la sobreexpresión de proteínas en líneas celulares, éstas fueron clonadas en el vector pIRES2eGFP. SPY1 fue clonada con un *tag* Flag en N-terminal, mientras que PURA y ERC2 se clonaron con un *tag* Flag en C-terminal. Este vector contiene un sitio interno de unión del ribosoma (IRES) entre el MCS y el gen para la proteína eGFP. De esta forma, la proteína clonada y el eGFP se transcriben al mismo tiempo sin generarse una proteína de fusión.

3. ENSAYO DE DOBLE HÍBIDO EN LEVADURA

3.1 Transformación de levaduras

Se utilizaron dos cepas de levadura de diferente tipo sexual (mat, de *mating type*). La cepa AH109 mat a forma parte del kit *Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System* (Clontech, 630489); la cepa Y187 mat α fue proporcionada por Rosa M. Aligué, de la Universidad de Barcelona.

La transformación de los plásmidos se hizo mediante el método del acetato de litio. Las construcciones basadas en el vector pGBKT7, que proporciona el gen *TRP1* necesario para complementar esa auxotrofia, se transforman en la cepa AH109 y plaquean en un medio sintético carente de Trp para su selección. Las construcciones basadas en el plásmido pGADT7, que proporciona el gen *LEU2*, se transforman en la cepa Y187 y plaquean en medio sintético carente de Leu. Para su crecimiento, las placas se mantienen a 30°C durante aproximadamente 48h.

3.2 Mating

Una colonia de cada una de las cepas, portadora de una ciclina o una CDK, se inocula en el correspondiente medio sintético líquido (carente de Trp para AH109 o carente de Leu para Y187). Estos cultivos se crecen durante aproximadamente 16h. a 30°C en agitación. Tras este tiempo se realiza un cultivo de 0.005 ODs (unidades de densidad óptica) de cada una de las ciclinas con 0.005 ODs de cada CDK con el fin de permitir el *mating*. Al día siguiente se plaquean 100 µl de una dilución 1/10 de cada uno de estos cultivos en medio carente de Trp y de Leu (DDO, doble *drop-out*) y en medio carente de Trp, Leu, His y Ade (QDO, cuádruple *drop-out*). El medio DDO permite el crecimiento de aquellas células que hayan realizado correctamente el *mating* y que, por lo tanto, sean portadoras de los dos plásmidos. El medio QDO sólo permite el crecimiento en caso de que las proteínas clonadas en los dos plásmidos interaccionen, activando la transcripción de los genes reporteros *HIS3* y *ADE2*. Estas placas se mantienen a 25°C entre 3 y 5 días para permitir el desarrollo de colonias.

3.3 Evaluación de la capacidad de crecimiento de los clones positivos

Los clones que presentaban crecimiento en QDO fueron cultivados en medio líquido para la posterior evaluación de su capacidad de crecimiento mediante la siembra de diferentes diluciones en forma de dots en diferentes tipos de medio: DDO, QDO y DDOX (DDO + X- α -Gal). El X- α -Gal (Cymit química, 02-J60151) es un sustrato cromogénico para la enzima α -galactosidasa, codificada por el gen reportero *MEL1*, que sólo se transcribe en caso de que haya interacción entre las proteínas de interés.

3.4 Preparación de extractos proteínicos de levadura para WB

A una cantidad de un cultivo en crecimiento exponencial correspondiente a 0,8 ODs se le añade un 20% de TCA (ácido tricloroacético), se incuba durante 10 min. para permitir la precipitación de las proteínas y se centrifuga a 4000 rpm durante 2 min. Tras eliminar el sobrenadante, el pellet se resuspende en 50 µl de SDS-SB1x.

4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR

4.1 Cultivo celular y transfección

Células Hek293T, U87, A549, MCF7 y HeLa se cultivaron en DMEM (Sigma-Aldrich, D5671) suplementado con un 10% de FBS (Capricorn Scientific, FBS-12A) inactivado y un 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich, P0781). Las células se mantuvieron a 37°C en ambiente húmedo con 5% CO₂. La ausencia de contaminación por micoplasma fue monitorizada periódicamente.

Células Hek293T sembradas en placas de 100 mm de diámetro a una confluencia del 80% fueron transfectadas con 30 µg de DNA plasmídico. Para ello se siguió el método de transfección con fosfato cálcico. Brevemente, se mezclan 30 µg de DNA, con 433 µl de buffer TE 0.1x, 242 µl de agua tamponada y 74 µl de CaCl₂ 2.5 mM. A esta mezcla se agregan 750 µl de HeBS 2x al tiempo que se vortea vigorosamente. A continuación se incuba a temperatura ambiente durante 15 min. y posteriormente se añade gota a gota sobre la placa de cultivo. A las 14 h. de la transfección el medio se reemplaza por medio fresco.

- TE 0.1x: 1 mM Tris-HCl pH 8, 0.1 mM EDTA
- Agua tamponada: 2.5 mM HEPES pH 7.3
- HeBS 2x: 50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄·7H₂O, ajustado a pH 7 con NaOH

4.2 Preparación de extractos celulares

A las células se les realiza un lavado con PBS 1x frío, para posteriormente añadirles tampón de lisis suplementado con inhibidores de proteasas (Thermo Scientific, 88266) y de fosfatasas (Thermo Scientific, 88667). Las células son despegadas mediante *scrapping* y mantenidas en hielo durante 15 min., tras lo cual son sonicadas y clarificadas por centrifugación a 14000 rpm a 4°C durante 15 min.

- Tampón de lisis de células: 25 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.2 % NP40 (IGEPAL CA630)*

*Para la búsqueda de interactores de CCNY mediante Co-IP seguida de espectrometría de masas (ver Resultados), además de este tampón, se utilizó el mismo pero aumentando la cantidad de NP40 al 1%.

4.3 Preparación de extractos de cerebro de rata

El tejido cerebral es homogeneizado mediante un *douncer* junto el tampón de extracción suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa, manteniéndolo siempre sobre hielo. Posteriormente, el homogeneizado es trasferido a un tubo y mantenido en rotación a 4°C durante 1h. El extracto es clarificado mediante centrifugación a 14000 rpm a 4°C durante 15 min.

- Tampón de extracción: 50 mM HEPES-KOH pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% NP40 (IGEPAL CA630), 1mM DTT

La cantidad de proteína en las muestras es determinada mediante el método de Bradford (Bio-Rad) según las instrucciones del fabricante.

Los cerebros utilizados proceden de ratas suministradas por el estabulario de la Universidad de Barcelona, con autorización del proyecto de experimentación con número de orden de la Generalitat de Catalunya 9228.

5. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS

5.1 Expresión y purificación de proteínas fusionadas a GST

Las proteínas fusionadas a GST, clonadas en el vector pGEX6P1, fueron transformadas en *E.-coli* BL21. Las células se llevan a crecimiento exponencial a 37°C durante 5 h. Tras este tiempo, la temperatura se baja a 18°C y se añade 200 mM IPTG (Applichem, A4773) para inducir la expresión de la proteína durante 16 h.

El cultivo se centrifuga y el pellet se resuspende en tampón de lisis. A continuación se añaden 125 µg/ml de lisozima (Sigma Aldrich, L6876), 16.5 µg/ml de DNasa I (Panreac, A3778,0100) y 16.5 µg/ml de RNasa A (Roche, 11579681001) y se incuba a 37°C durante

MATERIALES Y MÉTODOS

10 min. Tras este tiempo se añade tampón STET 1x y las células se sonicar durante 3 min., manteniéndolas en hielo, a una amplitud 100% en sonicador dr. hielscher (GmbH).

- Tampón de lisis de bacterias: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5% Glicerol, 0.1% Tritón X-100, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 100 mM PMSF, 10 mg/ml Leupeptina, 1 mg/mL Pepstatina, 0.5 M Benzamidina
- Tampón STET1x: 10 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 µg/ml Leupeptina, 1 µg/ml Pepstatina, 1 mM Benzamidina

Tras sonicar, las células son centrifugadas a 10000 g durante 10 min. en una centrífuga refrigerada a 4°C. El sobrenadante obtenido se incubaba con una resina de glutatión-sefarosa (GE Healthcare, 17-5132-01) previamente equilibrada con una mezcla de tampón de lisis y tampón STET10x. Se permite la unión de las proteínas a la resina durante 1 h. a 4°C en rotación. Tras este tiempo la resina se recupera por centrifugación a 1000 rpm y se lavan dos veces con la mezcla de tampón de lisis y STET10x y dos veces más con tampón de equilibrado. Las proteínas se eluyen con tampón de elución en rotación a 4°C durante 20 min.

- Tampón de equilibrado: 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT
- Tampón de elución: 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 10 mM L-Glutatión reducido (Sigma Aldrich, G4251)

Para los ensayos de fosforilación *in vitro*, las proteínas purificadas fueron sometidas a una gel filtración con el fin de eliminar agregados proteínicos. Esto realiza mediante el uso de una columna HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR (GE Healthcare, 17-1166-01) en el sistema de cromatografía líquida ÄKTA start (GE Healthcare, 29-0270-57 AF). Las fracciones correspondientes al peso molecular de los monómeros de proteína son recuperadas y concentradas mediante una columna Vivaspin 6 (Sartorius, VS0601) Las proteínas se conservan a -80°C hasta su uso.

Para los ensayos de *trapping*, las proteínas fueron mantenidas en las esferas de sefarosa; en ese caso, no se realizan los pasos de equilibrado ni de elución, y las esferas son

conservadas a 4°C hasta su uso. En adelante, estas proteínas serán denominadas “GST-Proteína”.

La cantidad y calidad de la proteína purificada se valoró mediante separación electroforética en geles de poliacrilamida seguida por tinción con Coomassie (Bio-Rad, 1610787).

5.2 Unión covalente (*crosslinking*) de anticuerpos a esferas magnéticas

Para cada reacción de co-inmunoprecipitación (Co-IP) se preparan 5 µg del anticuerpo de interés conjugados a 20 µl de esferas magnéticas-Proteína A/G (Thermo Scientific, 11844554). El *crosslinking* se lleva a cabo mediante el uso de DSS (Disuccinimidil suberato; Thermo Scientific, 21655) según las instrucciones del fabricante para el Pierce Crosslink Magnetic IP/Co.IP kit (Thermo Scientific, 88805).

5.3 Ensayo de *trapping*

Un volumen de extracto celular/de cerebro que contenga 2.5-5 mg de proteínas se incuba con la cantidad adecuada de resina de sefarosa que contiene la GST-Proteína de interés durante 16 h. a 4°C en rotación. Pasado este tiempo, la resina se recupera por centrifugación a 1500 rpm y se transfiere a una columna (Mobicol, M1002) que contiene un filtro de 35 µm de diámetro de poro (Mobicol, M513515). De esta forma la resina es lavada por gravedad para eliminar uniones inespecíficas con un total de 10 ml de tampón de lisis de células o tampón de extracción, según el caso, suplementados con inhibidores de proteasas y fosfatasas. Finalmente, la resina se recupera con 20 µl del tampón correspondiente, y se añaden 5 µl de SDS-SB5x.

5.4 Co-Inmunoprecipitación

El volumen necesario de extracto celular que contenga 3-5 mg de proteína se incuba con 20 µl de esferas magnéticas con el anticuerpo conjugado durante 14-15 h. a 4°C en rotación. Pasado este tiempo, las esferas son lavadas, mediante un soporte imantado, con el fin de eliminar uniones inespecíficas. Se realizan dos lavados con tampón de lisis de

células, seguidos por un lavado con agua ultra-pura. Para eluir las proteínas, se añaden 20 μ l de agua ultra-pura y 5 μ l de SDS-SB5x y se incuban las muestras 10 min. a 30°C.

Los anticuerpos utilizados fueron: α -Flag (F3165) y α -PSTAIR (P7962) de Sigma Aldrich; y α -CDK5 (sc-6247), α -CDK16 (sc-53410), α -CDK16 (sc-53410) e IgG normal de conejo (sc-320) de Santa Cruz Biotechnology.

5.5 Tiofosforilación y captura de sustratos de CDK16

Un extracto de células HeLa (2 mg de proteína) se incubaba con un total de 5 μ M de GST-CCNY a solas o en combinación con 500 nM de GST-CDK16 WT o GST-CDK16AS en una reacción de tiofosforilación que incluye N⁶-2-Feniletil-ATP- γ -S (Axxora, BLG-P026-05), ATP no modificado (Sigma Aldrich, A7699) y GTP (Sigma Aldrich, G8877). La reacción es incubada durante 1 h. a temperatura ambiente antes de finalizar la reacción mediante adición de 50 mM EDTA.

- Tampón de tiofosforilación: 50 mM HEPES pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 250 μ M N⁶-2-Feniletil-ATP- γ -S, 3 mM GTP

Para comprobar la tiofosforilación, a 25 μ l de cada una de las reacciones se añadió 1.8 mM del agente alquilante PNBm (p-nitrobenzil mesilato; proporcionado por Kevan M. Shokat, de la Universidad de California, San Francisco). Esta reacción se incubaba durante 30 min. a temperatura ambiente. Finalmente, se añade SDS-SB5x y la fosforilación se analiza mediante WB.

Para la captura covalente de proteínas tiofosforiladas se siguió el protocolo descrito por el grupo de Shokat y Mukherjee (Levin *et al.* 2016). Las muestras se desnaturalizan añadiendo 60% Urea (peso/vol) y 10 mM TCEP (Tris-2-carboxyethyl-phosphine; Thermo Fisher Scientific, 77720) e incubando durante 30 min. a 55°C. Las muestras se diluyen a 2 mM Urea con 50 mM Bicarbonato de amonio y son digeridas O/N a 37°C con tripsina (Promega) a una ratio de 1:20. Los péptidos obtenidos así son acidificados con TCA, las sales se eliminan en una columna SepPak C18 (Waters) y las muestras son secadas mediante vacío. Posteriormente, los péptidos son resuspendidos en 50 mM HEPES y 50% (vol/vol) acetonitrilo y ajustados a pH 7. Las muestras son entonces incubadas en oscuridad O/N en rotación con 100 μ l de resina de iodoacetil-sefarosa (Thermo Fisher

Scientific). La resina es lavada por gravedad con solución de lavado y eluida con 1 mg/ml de oxona (Sigma). Se eliminan las sales de los péptidos mediante ZipTips (Millipore) y las muestras se secan mediante vacío.

- Solución de lavado: 5 M NaCl, 50% (vol/vol) acetonitrilo, 5% (vol/vol) ácido fórmico, 10 mM DTT

Las muestras fueron analizadas por el servicio de proteómica de la Universidad de California, San Francisco mediante un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap Velos. Los datos obtenidos se procesaron mediante Protein Prospector (v5.10.10).

5.6 Ensayo de fosforilación *in vitro*

Los ensayos de fosforilación llevados a cabo en este trabajo están basados en el protocolo descrito por el grupo de Shokat (Blethrow *et al.* 2008). Éste método está basado en la utilización de un ATP modificado. Esta modificación consiste en una sustitución tiol en el fosfato gamma del ATP. Este ATP- γ -S (Axxora, BLG-A060-05) es utilizado por la quinasa durante la reacción, de forma que sus sustratos quedan marcados con un tiofosfato. Mediante alquilación de estas proteínas portadoras de un grupo tiol, se genera un éster tiofosfato que podrá ser reconocido mediante el uso de un anticuerpo específico.

Las diferentes GST-Proteínas fueron utilizadas para valorar la actividad quinasa de los complejos. La mezcla de reacción (volumen final de 25 μ l) incluye 200 nM CDK16, 7-5 μ M SPY1 o CCNY, 2.5 μ l de tampón quinasa 10x y 250 μ M ATP- γ -S. En el ensayo de fosforilación de PRC1 por el complejo CDK16-CCNY, PRC1-WT o PRC1-Ala (mutante no fosforilable) se añade a la mezcla anterior a una concentración final de 3 μ M. Para el ensayo que incluye al complejo CDK1-CCNB1, éste fue adquirido a Sigma Aldrich (SRP5009) y añadido a una concentración total de 200 nM.

- Tampón quinasa 10x: 500 μ M HEPES-KOH pH 7.5, 1.5 M NaCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT

Tras la incubación durante 30 min. a 30°C, la reacción se detiene añadiendo 50 mM EDTA. A continuación se lleva a cabo la alquilación de las proteínas por adición del agente alquilante PNBM, que se añade a una concentración de 1.8 mM. Esta reacción se

incuba durante 30 min. a temperatura ambiente. Finalmente, se añade SDS-SB5x y la fosforilación se analiza mediante WB.

Para valorar que la cantidad de las diferentes proteínas es la adecuada en cada una de las reacciones, las muestras se utilizan en dos WB en paralelo. Una de las membranas es revelada con un anti-éster tiofosfato y la otra mediante un anti-GST. Alternativamente, tras el revelado con el anti-éster tiofosfato, la membrana es teñida con Coomassie.

5.7 Análisis de proteínas mediante Western Blot

Los diferentes tipos de muestras, preparadas en SDS-SB, se calientan a 90°C durante 5 min. y las proteínas son separadas por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida y transferidas a una membrana de PVDF Immobilon-P (Millipore, IPVH00010). Seguidamente, la membrana se bloquea durante 30 min. con 5% de leche en polvo no grasa, y se incuba con el anticuerpo primario en TBS-T con 5% de leche en polvo. Los siguientes anticuerpos primarios fueron utilizados: α -CDK2 1:500 (sc-163), α -CDK5 1:500 (sc-6247), α -CDK6 1:200 (sc-7961), α -CCNG1 1:200 (sc-320), α -GAL4 DNA-BD 1:1000 (sc-577) y α -HA 1:400 (sc-805) de Santa Cruz Biotechnology; α -CCNY 1:1000 (ab114086), α -MED23 1:250 (ab 200351) y α -éster tiofosfato 1:5000 (ab92570) de Abcam; α -PSTAIRES 1:5000 (P7962), α -G6PDH 1:500 (A9521) y α -Flag 1:500 (F3165) de Sigma Aldrich; α -CDK16 1:1000 (10102-1AP) de Proteintech y α -GST 1:10000 (CSB-MA000021M0M) de CusAb.

El tiempo de incubación con α -GST es de 1 h. a temperatura ambiente; el resto de anticuerpos se incubaron O/N. Tras lavar las membranas, éstas se incuban con los respectivos anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano (HRP) (Jackson Laboratories) durante 1 h. a temperatura ambiente. Tras lavar, las membranas se revelan mediante Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore, WBLUF0500) y las imágenes se capturan mediante GeneSnap (Syngene).

6. ANÁLISIS MS

Muestras procedentes tanto de los ensayos de *trapping* como de Co-IPs fueron separadas electroforéticamente en geles pre-fabricados de poliacrilamida (Bio-Rad). Los geles fueron teñidos con ImperialTM Protein Stain (Thermo Scientific, 24615) para la evaluación de la calidad de las muestras antes del análisis por espectrometría de masas.

Las muestras fueron enviadas al servicio de proteómica de la Universidad de Chicago, donde se sometieron a digestión trípica en gel y se analizaron mediante espectrómetro de masas ESI-FTICR. Los datos obtenidos fueron procesados mediante MASCOT con el fin de identificar a los interactores.

RESULTADOS

RESULTADOS

PARTE 1

IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS COMPLEJOS CDK-CICLINA

1.1 INTERACTOMA DE CICLINAS ATÍPICAS EN CEREBRO

Con el fin de identificar nuevos complejo CDK-Ciclina, se decidió hacer una primera aproximación consistente en ensayos de *trapping*, utilizando a las ciclinas como cebo, seguidos por espectrometría de masas. Esta estrategia pretende identificar no sólo CDKs, sino otros potenciales interactores de las ciclinas, ya que éstas, además de activar a las CDKs, les confieren la especificidad por un determinado sustrato (Solomon, Lee, y Kirschner 1992). Además, se ha descrito recientemente que las ciclinas podrían tener funciones independientes de CDK (revisado en Hydbring *et al.* 2016). Esto hace interesante investigar las redes de interacción de las ciclinas, ya que podría permitir encontrar sustratos para sus CDKs, o dilucidar en qué procesos biológicos o vías de señalización podrían estar implicadas.

Como ya se comentó en la introducción, CCNI guarda un considerable grado de similitud con la ciclina de *S. cerevisiae* Pcl1. Las nuevas ciclinas de mamífero más estrechamente relacionadas con CCNI son CCNG1 y CCNG2. Por este motivo, se incluyeron en el estudio del interactoma de nuevas ciclinas. También se incluyó a CNTD2, una proteína muy poco estudiada, pero que nuestro grupo ha descubierto recientemente que podría estar involucrada en la malignidad del cáncer de pulmón y colon (Gasa *et al.* 2017).

RESULTADOS

La estrategia seguida para investigar el interactoma de estas proteínas se resume en la Figura 7.

Las diferentes ciclinas fueron clonadas en el vector pGEX6P1 de expresión bacteriana. Las proteínas, expresadas como proteínas de fusión a un GST en N-terminal, fueron purificadas mediante resina de glutatión-sefarosa, mantenidas en las esferas e incubadas con un extracto de cerebro de rata para permitir la unión con sus posibles interactores. Las muestras fueron posteriormente cargadas en un gel de poliacrilamida para su separación electroforética y posterior análisis mediante espectrometría de masas.

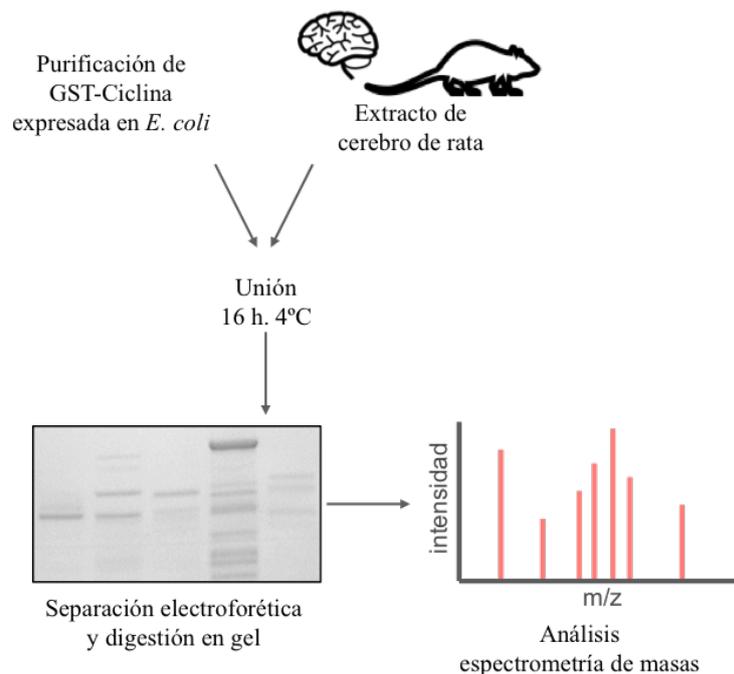


Figura 7. Representación esquemática de la estrategia seguida para investigar el interactoma de las ciclinas. Las esferas de sefarosa con las ciclinas unidas a GST, o con un GST solo (control negativo), se incubaron con un extracto de cerebro de rata durante 16 h. a 4°C para permitir la unión de los interactores a las ciclinas. Tras lavar las esferas, éstas se hirvieron con tampón de carga y se separaron electroforéticamente en un gel de poliacrilamida. Posteriormente el gel fue teñido con Coomassie y, tras su digestión con tripsina, analizado mediante espectrometría de masas.

Este experimento se realizó tres veces de forma independiente. De cada uno de los experimentos se llevó a cabo un duplicado interno, de forma que para cada ciclina se

inyectaron seis muestras en el espectrómetro de masas. Por otro lado, un total de dieciocho muestras correspondientes al control negativo (GST solo), se incluyeron en el análisis.

Del notable número de interactores obtenido, se seleccionaron aquellos que pasaron una serie de filtros. Los definidos como interactores fuertes son aquellos que pasaron un filtro muy restrictivo, en el que solo se seleccionaron aquellas proteínas que fueron detectadas en, como mínimo, dos de los tres replicados realizados, y no detectadas en ninguno de los dieciocho replicados del control negativo. Como se puede observar en las Tablas 7 y 8, entre los interactores fuertes de cada una de las ciclinas ninguna CDK fue detectada.

Los interactores de CCNI y CNTD2 se muestran en la Tabla 4. También se señalan otros interactores de interés que no pasan el filtro restrictivo, pero que aun así no fueron detectados en ninguno de los dieciocho controles negativos. Entre estos últimos, destaca la presencia de CDK18 como posible interactor de CCNI. También se observa a CDK5R1 (sinónimo de p35) que es, junto con CCNI, uno de los interactores descritos de CDK5.

Tabla 4. Interactores de cerebro de CCNI y CNTD2

CCNI	Número de apariciones		CNTD2	Número de apariciones		
	Interactores fuertes	GST-CCNI (n=6)		GST (n=18)	Interactores fuertes	GST-CNTD2 (n=6)
DHX3		4			6	0
EEF1G		4			6	0
VAR2		3			3	0
NUP107		2			2	0
SPAG1		2			2	0
AFDN		2			2	0
FTSJ3		2			2	0
PAR1		2			2	0
Otros interactores de interés						
CDK18		1			2	0
CDK5R1		1			2	0
					2	0
					2	0
					2	0
					2	0
					2	0
					2	0
					2	0
					2	0
					2	0

RESULTADOS

En la Tabla 5 se muestran los interactores de CCNG1 y CCNG2 que cumplen las condiciones de los filtros mencionados. En este caso, mencionar como posibles interactores de CCNG1 a RNF8, que es una E3 ubiquitín-ligasa homóloga a la Dma1 que en *S. cerevisiae* ubiquitina a Pcl1 para su degradación (Hernández-Ortega *et al.* 2013). También aparece CDK16 como posible interactor de esta ciclina.

Tabla 5. Interactores de cerebro de CCNG1 y CCNG2.

CCNG1	Número de apariciones		CCNG2	Número de apariciones		
	Interactores fuertes	GST-CCNG1 (n=6)		GST (n=18)	Interactores fuertes	GST-CCNG2 (n=6)
ERC2		4	0	ERC2	6	0
PURA		3	0	TBPL2	3	0
HNRNPH1		2	0	CHGB	3	0
HNRNPF		2	0	MUC2	2	0
PAF1		2	0	PPIP5K1	2	0
HS3ST1		2	0	STIM1	2	0
DCAF8		2	0	DYNC1H1	2	0
GOLGA4		2	0	ROBO1	2	0
Otros interactores de interés				PCLO	2	0
RNF8		1	0			
CDK16		1	0			

En las Tablas 9, 10, 11 y 12 que se presentan a continuación se muestra el nombre completo de las proteínas detectadas como interactores para CCNI, CNTD1, CCNG1 y CCNG2, respectivamente. También se indica para cada interactor aquellas funciones que figuran en la base de datos UniProt y su implicación o no en cáncer según OpenTargets.

Tabla 6. Funciones descritas¹ de los interactores de CCNI en cerebro y su posible implicación en cáncer².

CCNI			
SÍMBOLO	NOMBRE ¹	FUNCIÓN ¹	IMPLICACIÓN EN CÁNCER ²
DHX30	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30	Participa en ensamblaje de la subunidad grande de los ribosomas mitocondriales. Requerida para función óptima de la proteína anti-viral ZC3HAV1. Asocia con DNA mitocondria.	x
EEF1G	Elongation factor 1-gamma	Probablemente participa en el anclaje del complejo de traducción a otros componentes celulares.	x
VARS2	Valine-tRNA ligase, mitochondrial	Participa en la biosíntesis de proteínas mitocondriales	x
NUP107	Nuclear pore complex protein Nup107	Participa en el ensamblaje o mantenimiento del complejo del poro nuclear. Requerida para el ensamblaje de proteínas periféricas al complejo.	x
SPAG1	Sperm-associated antigen 1	Podría participar en el ensamblaje de los brazos de dineína ciliares. Podría participar en la fertilización del oocito. Une GTP y tiene actividad GTPasa.	x
AFDN	Afadin	Probablemente junto con E-cadherina-catenina forma parte del sistema de adhesión, que participa en la organización de uniones adherentes entre neuronas. Conecta nectina al citoesqueleto.	✓
FTSJ3	pre-rRNA processing protein FTSJ3	Probable metil transferasa implicada en el procesamiento de pre-rRNAs y la formación de la subunidad ribosómica 40S	x

¹Según UniProt (www.uniprot.org)

²Según OpenTargets con Score > 0.2 (www.targetvalidation.org)

RESULTADOS

Tabla 7. Funciones descritas¹ de los interactores de CNTD2 en cerebro y su posible implicación en cáncer².

CNTD2			
SÍMBOLO	NOMBRE ¹	FUNCIÓN ¹	IMPLICACIÓN EN CÁNCER ²
MED23	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 23	Componente del Complejo Mediador de la transcripción. Co-activador involucrado en la transcripción regulada de prácticamente todos los genes dependientes de RNA polimerasa II.	x
C9	Complement component C9	Forma parte del complejo de ataque a la membrana, que tiene un papel clave en la respuesta inmune.	✓
UCN2	Urocortin-2	Inhibe la ingesta, retrasa el vaciado gástrico y disminuye el edema inducido por calor. Podría ser un ligando endógeno para el mantenimiento de la homeostasis post estrés.	✓
CCDC50	Coiled-coil domain-containing protein 50	Implicada en la vía de señalización de EGFR	✓
DNAJB11	DnaJ homolog subfamily B member 11	Co-chaperona de HSPA5. Estimula la actividad ATPasa de HSPA5.	✓
PCLO	Protein piccolo	Podría actuar como proteína de <i>scaffolding</i> implicada en las zonas activas de la sinopsis y el tráfico vesicular sináptico.	✓
SCN11A	Sodium channel protein type 11 subunit alpha	Media la permeabilidad voltaje-dependiente al sodio de membranas excitables.	✓

¹Según UniProt (www.uniprot.org)

²Según OpenTargets con Score > 0.2 (www.targetvalidation.org)

Tabla 8. Funciones descritas¹ de los interactores de CCNG1 en cerebro y su posible implicación en cáncer².

CCNG1			
SÍMBOLO	NOMBRE ¹	FUNCIÓN ¹	IMPLICACIÓN EN CÁNCER ²
ERC2	ERC protein 2	Probablemente involucrada en la regulación del tráfico vesicular en la zona activa de la sinapsis.	✓
PURA	Transcriptional activator protein Pur-alpha	Probable factor activador de la transcripción que se une a las zonas ricas en purinas del elemento PUR localizado <i>up-stream</i> del gen MYC. Podría participar en la iniciación de la realización y en la recombinación.	x
HNRNPH1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	Forma parte del complejo hnRNP necesario para el procesamiento del pre-mRNA.	✓
HNRNPF	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	Forma parte del complejo hnRNP necesario para el procesamiento del pre-mRNA.	x
PAF1	RNA polymerase II-associated factor 1 homolog	Componente del complejo PAF1 que tiene múltiples funciones durante la transcripción por la RNA polimerasa II. Implicado en la regulación del desarrollo y mantenimiento de la pluripotencia de células madre embrionarias.	✓
HS3ST1	Heparan sulfate glucosamine 3-O-sulfotransferase 1	Cataliza el paso limitante de la tasa de biosíntesis de heparán sulfato.	x
DCAF8	DDB1- and CUL4-associated factor 8	Podría funcionar como receptor de sustrato para el complejo E3 ubiquitín-ligasa CUL4-DDB1.	x

¹Según UniProt (www.uniprot.org)

²Según OpenTargets con Score > 0.2 (www.targetvalidation.org)

RESULTADOS

Tabla 9. Funciones descritas¹ de los interactores de CCNG2 en cerebro y su posible implicación en cáncer².

CCNG2			
SÍMBOLO	NOMBRE ¹	FUNCIÓN ¹	IMPLICACIÓN EN CÁNCER ²
ERC2	ERC protein 2	Probablemente involucrada en la regulación del tráfico vesicular en la zona activa de la sinapsis.	✓
TBPL2	TATA box-binding protein-like protein 2	Factor de transcripción requerido para la diferenciación de mioblastos a miocitos.	x
CHGB	Secretogranin-1	Proteína de los gránulos de secreción neuroendocrina, que podría ser el precursor de otros péptidos biológicos activos.	✓
MUC2	Mucin-2	Protege superficies mucosas frente a partículas y agentes infecciosos.	✓
PPIP5K1	Inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol-pentakisphosphate kinase 1	Quinasa que participa en la síntesis de inositol-pirofosfatos.	x
STIM1	Stromal interaction molecule 1	Sensor de calcio.	x
DYNC1H1	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	Motor para el tráfico retrógrado de vesículas y organelas.	✓
ROBO1	Roundabout homolog 1	Participa en el desarrollo neuronal. Papel en la migración celular. Podría ser requerida para el desarrollo pulmonar.	✓

¹Según UniProt (www.uniprot.org)

²Según OpenTargets con Score > 0.2 (www.targetvalidation.org)

A pesar de no detectarse CDKs, algunos de los interactores fuertes (los señalados en negrita en las tablas 8, 9 y 10) fueron seleccionados con el fin de validar, mediante otra aproximación experimental, los resultados del análisis proteómico.

1.1.1 PURA y ERC2 interactúan con CCNG1

PURA (*Purine Rich element binding protein A*) es una proteína de unión a DNA y RNA que podría tener diversas funciones en replicación, transcripción, traducción y en el transporte de RNA (Gallia, Johnson, y Khalili 2000) y que participa en el control del crecimiento celular (Stacey *et al.* 1999; Barr y Johnson 2001; Darbinian *et al.* 2001). También presenta mutaciones en el 14% de carcinomas hepatocelulares de células claras y, al igual que ERC2, en el 14% de los cánceres de próstata neuroendocrinos (cBioPortal).

Además, presenta una elevada asociación con desórdenes intelectuales (Khalili *et al.* 2003).

ERC2 (*ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 2*) es una proteína que parece involucrada en la regulación del tráfico vesicular en la zona activa de las sinapsis (Jaewon Ko *et al.* 2003; J. Ko *et al.* 2006). Se encuentra además mutada en un 23,4% de los cánceres de próstata neuroendocrinos y en un 16,5% de los melanomas según cBioPortal.

PURA y ERC2, con un Flag C-terminal, fueron sobreexpresadas en células Hek293T. Sobre los extractos celulares se llevó a cabo una IP mediante el uso de un anticuerpo anti-Flag y, tal y como se observa en la Figura 8, CCNG1 co-inmunoprecipita tanto con PURA como con ERC2, pero no con el control transfectado con el plásmido vacío.

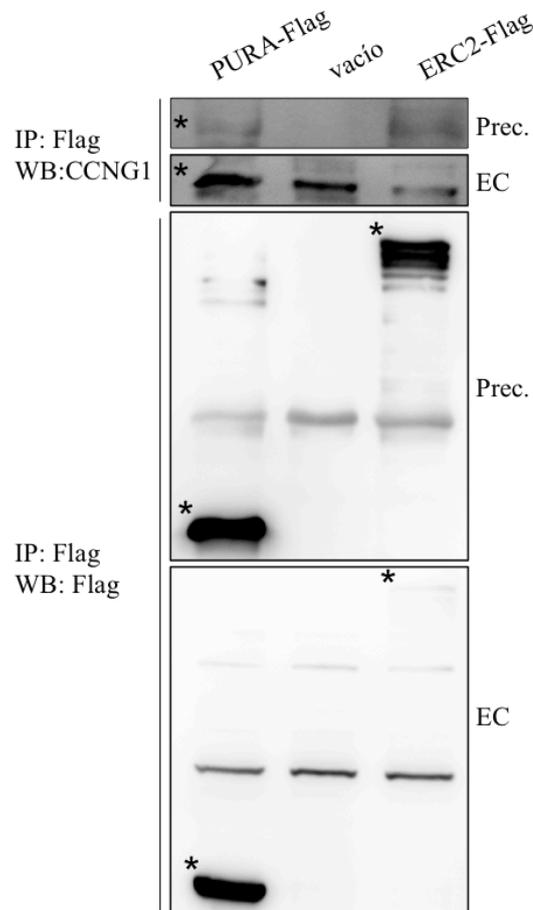


Figura 8. PURA y ERC2 interaccionan con CCNG1. Células Hek293T fueron transfectadas con el vector de expresión pIRES2eGFP vacío, pIRES2eGFP-PURA-Flag o pIRES2eGFP-ERC2-Flag. A las 48 h. de la transfección, el extracto celular fue sometido a IP usando un anticuerpo anti-Flag. La interacción con CCNG1 fue analizada mediante WB usando un anticuerpo anti-CCNG1. EC corresponde a un 0,8% de la cantidad de proteína usada para la IP.

RESULTADOS

La comprobación de la interacción con CCNG2 no pudo ser llevada a cabo debido a que la proteína endógena es indetectable con el anticuerpo contra CCNG2 de que disponemos.

1.1.2 MED23 interacciona débilmente con CNTD2

MED23 forma parte del Complejo Mediador, conformado por más de veinte subunidades proteínicas distribuidas en cuatro módulos. Este complejo es crítico en la regulación de la transcripción por la RNA polimerasa II, ya que a través del mismo se integran señales de diferentes vías (Malik y Roeder 2010; Taatjes 2010). MED23 tiene un papel crítico en el proceso de tumorigénesis. Sus efectos son variados según el tipo de tumor del que se trate: en cáncer de pulmón con mutaciones activadoras de *K-Ras*, MED23 es esencial (X. Yang *et al.* 2012), mientras que en el carcinoma de células escamosas de esófago parece tener efectos supresores (Shi, Han, *et al.* 2014)

En este caso, y ante la dificultad de clonar un gen de una longitud tan grande (5240 pares de bases), se optó por repetir la estrategia del *trapping* de GST-CNTD2 con el fin de detectar MED23 mediante WB.

En la Figura 9 se observa una débil, pero diferencial, banda correspondiente a MED23 en el carril de CNTD2 que confirma la existencia de esta interacción.

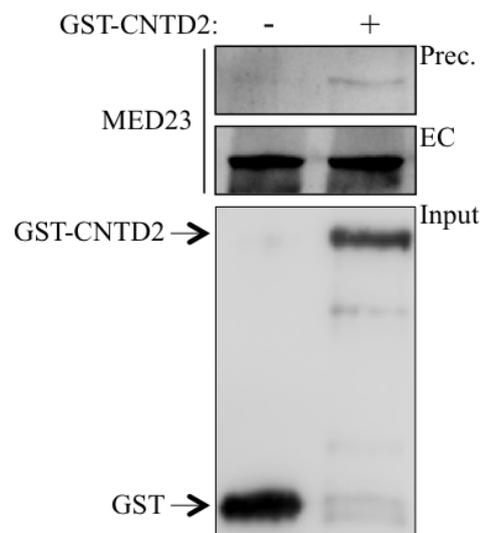


Figura 9. CNTD2 interacciona con MED23. Ensayo de *trapping* sobre un extracto de cerebro de rata. El extracto fue incubado con GST o GST-CNTD2 purificadas de *E. coli*. MED23 fue detectada en un WB mediante el uso de un anticuerpo específico, mientras que las proteínas recombinantes se siguieron mediante un anti-GST. EC corresponde a un 0,6% de la cantidad de proteína usada para el *trapping*.

Aunque no se haya identificado ninguna interacción fiable CDK-Ciclina, de una lista de más de doscientas proteínas detectadas para cada ciclina, y tras la aplicación de unos filtros considerablemente restrictivos, las tres proteínas seleccionadas para su validación se confirmaron como interactores de sus respectivas ciclinas, lo que sugiere que los nuevos interactores propuestos podrían ser válidos. Estos resultados abren la vía a futuras líneas de investigación para el grupo.

1.2 IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS COMPLEJOS CDK-CICLINA MEDIANTE ENSAYO DE DOBLE-HÍBRIDO

En paralelo a la estrategia proteómica descrita en el punto anterior, se decidió buscar nuevas parejas CDK-Ciclina mediante un sistema diferente. Se realizó un ensayo de doble híbrido en levadura (Y2H). La Figura 10 representa, de forma esquemática, las bases del ensayo.

En este caso, y al contrario que en el apartado anterior, se decidió trabajar con todas las ciclinas atípicas. En el caso de CNPPD1 se decidió trabajar con un fragmento N-terminal de la proteína debido a la existencia de una secuencia correspondiente a un posible dominio transmembrana, lo que haría inviable incluirla en el mismo *screening* que al resto de ciclinas. CNTD2, acerca de la cual prácticamente no hay información bibliográfica, tiene reportada una isoforma más corta, generada por *splicing* alternativo (Ota *et al.* 2004); esta isoforma también fue clonada para este estudio, y nos referiremos a ella como CNTD2-2.

En cuanto a las CDKs, debido a que nuestro grupo está especialmente interesado en la regulación del ciclo celular, se seleccionaron dos de las que tienen funciones canónicas (CDK1 y 6), las nuevas CDKs que forman parte del subgrupo relacionado con la regulación del ciclo celular y las poco caracterizadas CDKs, mientras que de aquellas CDKs implicadas en transcripción tan solo se incluyó a CDK10.

Las ciclinas, que actuarán como “cebo”, se clonaron en el vector de expresión pGBKT7. En este sistema, la ciclina se expresa como una proteína de fusión que consta de un dominio de unión al DNA *GAL4* (*GAL4* DNA-BD), un *tag* c-Myc y la propia ciclina. Por otro lado, las CDKs, que actuarán como “presa”, se clonaron en el vector pGADT7, en este caso fusionadas a un dominio de activación del *GAL4* (*GAL4* AD) y a un *tag* HA.

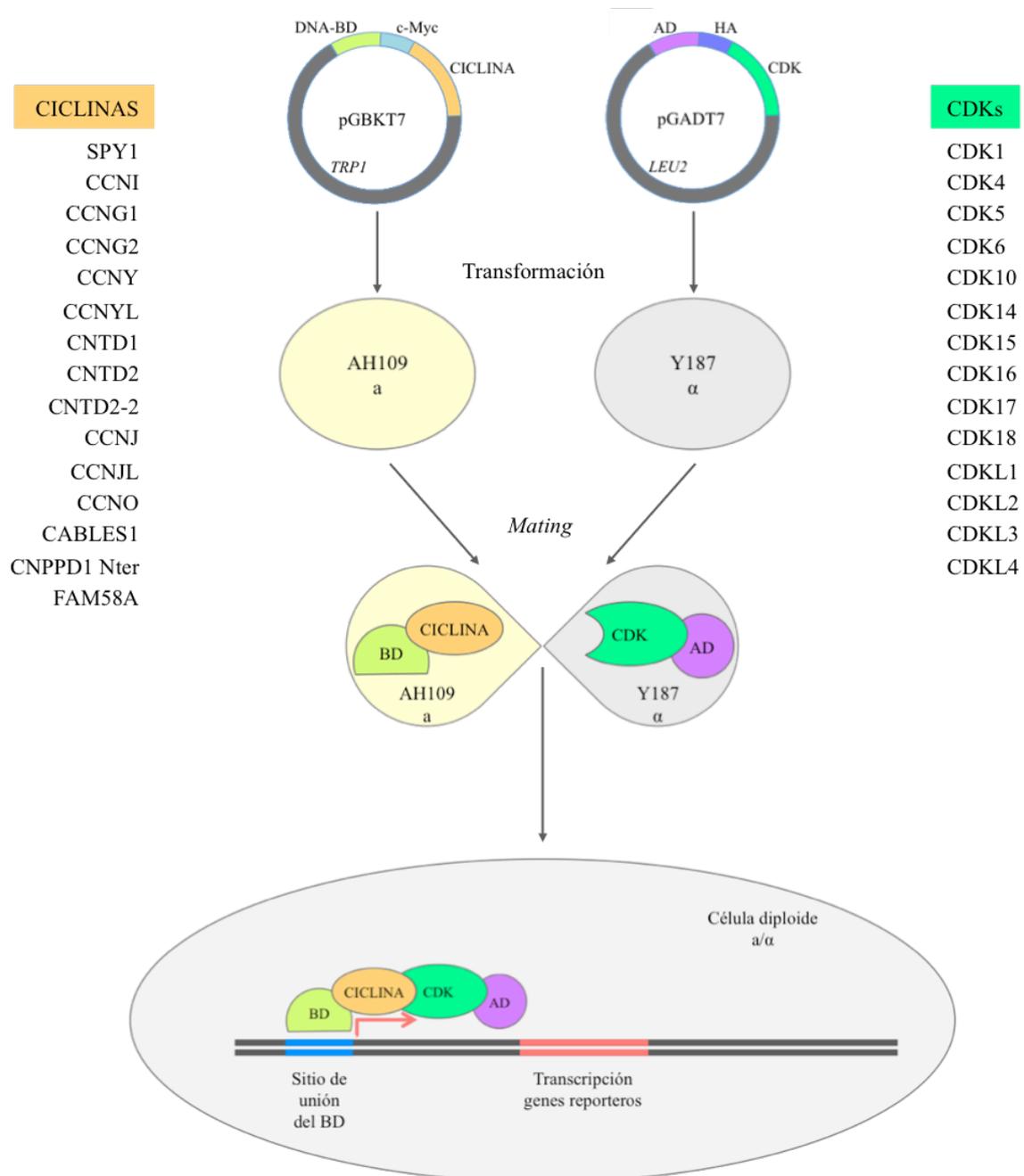


Figura 10 Esquema del ensayo Y2H. En la parte izquierda se muestran las ciclinas que fueron clonadas, y en la derecha las CDKs.

RESULTADOS

De esta forma se generaron dos colecciones de clones: una de ciclinas, transformadas en la cepa de levadura AH109 mat a (*mating* tipo a), y una de CDKs, transformadas en la cepa Y187 mat α (Tabla 10).

Tabla 10. Colección de clones de ciclinas y CDKs humanas.

Tipo	Vector de clonación			Cepa de levadura		Genes clonados
	Nombre	Marcador de selección	Tag	Nombre	Mating	
Ciclinas	pGBKT7	<i>TRP1</i>	GAL4 DNA-BD c-Myc	AH109	a	<i>CABLES1</i> <i>CCNI</i> <i>CCNO</i> <i>CNPPD1</i> <i>Nter</i> <i>CNTD2-2</i> <i>CCNG1</i> <i>CCNJ</i> <i>CCNY</i> <i>CNTD1</i> <i>FAM58A</i> <i>CCNG2</i> <i>CCNJL</i> <i>CCNYL1</i> <i>CNTD2</i> <i>SPY1</i>
CDKs	pGADT7	<i>LEU2</i>	GAL4 AD HA	Y187	α	<i>CDK1</i> <i>CDK6</i> <i>CDK15</i> <i>CDK18</i> <i>CDKL3</i> <i>CDK4</i> <i>CDK10</i> <i>CDK16</i> <i>CDKL1</i> <i>CDKL4</i> <i>CDK5</i> <i>CDK14</i> <i>CDK17</i> <i>CDKL2</i>

Mediante WB se evaluó la correcta expresión de cada una de las ciclinas y CDKs (Figura 11). CDK1 no se muestra ya que no se consiguió ver una clara expresión de la misma en la mayoría de experimentos, probablemente debido a que resulta tóxica.

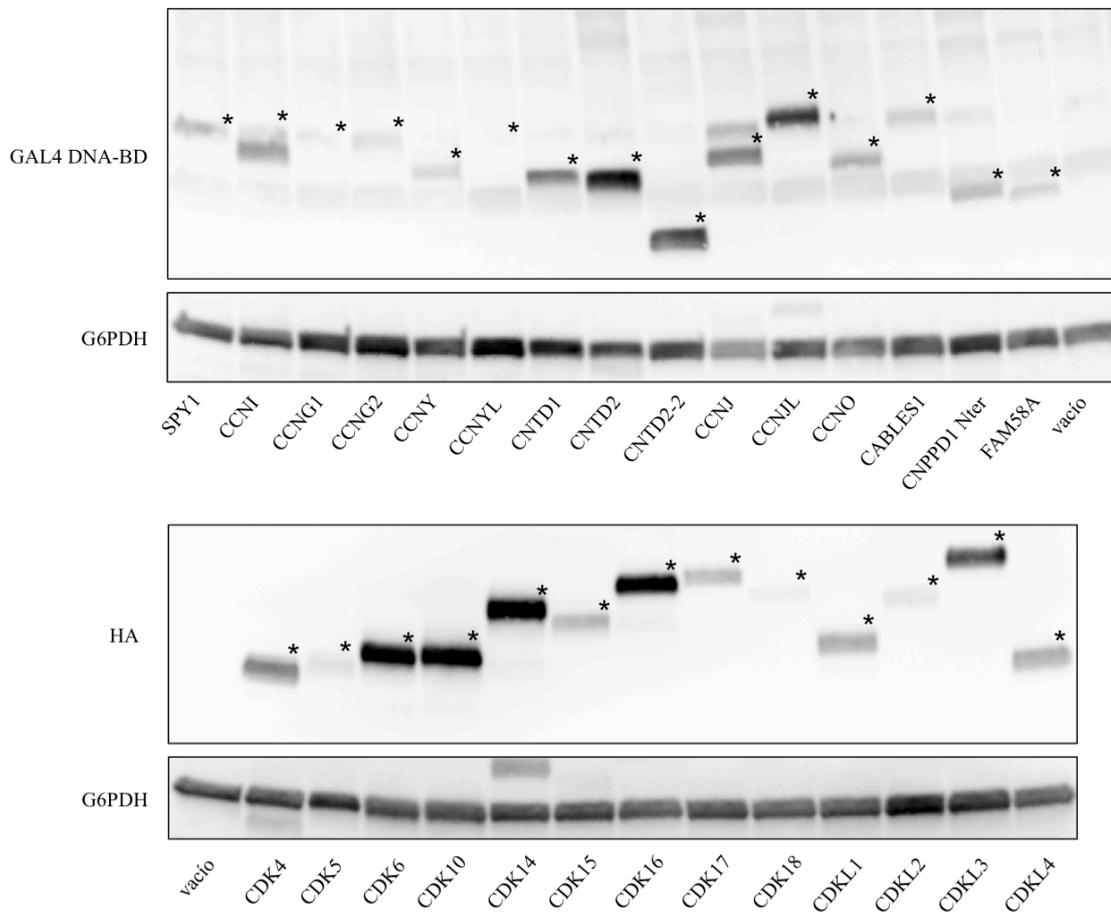


Figura 11 Comprobación de la expresión de ciclinas y CDKs. La correcta expresión de las diferentes ciclinas fue evaluada mediante el uso de un anticuerpo anti-GAL4 DNA-BD, mientras que el seguimiento de las CDKs se hizo mediante un anti-HA. Los asteriscos señalan las bandas correspondientes a las proteínas de interés. Un anti-G6PDH se utilizó como control de carga.

El vector pGBKT7 proporciona el gen *TRP1*, mientras que el pGADT7 proporciona el *LEU2*, necesarios para complementar estas auxotrofías presentes en las cepas AH109 y Y187. Tras el *mating*, las células diploides, que llevarán incorporados ambos plásmidos, podrán crecer en un medio DDO (doble *drop-out*), sin Trp ni Leu. En el caso de que las proteínas clonadas interaccionen, el GAL4 DNA-BD y el GAL4 AD se acercan lo suficiente como para formar un factor de transcripción funcional. De esta forma, se activa la transcripción de los genes reporteros *HIS3*, *ADE2* y *MEL1*, controlados por tres

RESULTADOS

promotores diferentes. La transcripción de estos genes permite a las células crecer en medio de cultivo (QDO, cuádruple *drop-out*) carente, además de Trp y Leu, de His y Ade, y hará que se exprese y secrete la enzima α -galactosidasa, lo que permite la transformación del sustrato cromogénico X- α -Gal en un producto de color azul, haciendo que las colonias se vean de este color. Se realizaron un total de 195 cruces, cada una de las ciclinas de la colección con cada una de las CDKs (ya que CDK1 fue descartada debido a su ausencia de expresión). Tras hacer los cruces, los cultivos se sembraron en placas de medio DDO y QDO. Tras comprobar el correcto *mating* indicado por el crecimiento en DDO, se valoró la existencia de interacciones, señalada por el crecimiento en QDO (Tabla 11). El *screening* se realizó un total de tres veces de forma independiente, y sólo se consideraron interacciones positivas aquellas que se repitieron en los tres experimentos.

Tabla 11. Interacciones detectadas mediante el ensayo Y2H. Las celdas verdes y con dos “++” corresponden a las consideradas interacciones fuertes; las celdas amarillas y con un “+” corresponden a interacciones menos intensas. La valoración de la fuerza de interacción se llevó a cabo considerando tanto la capacidad de crecimiento de las células como el nivel de expresión de la CDK.

	CDK4	CDK5	CDK6	CDK10	CDK14	CDK15	CDK16	CDK17	CDK18	CDKL1	CDKL2	CDKL3	CDKL4
CABLES1													
CCNG1													
CCNG2													
CCNI		++	++		+	+	+	+	+				
CCNJ													
CCNJL													
CCNO													
CCNY					+	++	+	++	+				
CCNYL1							+						
CNPPD1 Nter													
CNTD1													
CNTD2													
CNTD2-2													
FAM58A													
SPY1		+					++	++	+				

Se detectaron un total de 17 interacciones, algunas de las cuales han sido previamente reportadas: CDK5-SPY1 (Dinarina *et al.* 2005), CDK5-CCNI (Brinkkoetter *et al.* 2009; So *et al.* 2015), CDK14-CCNY (Jiang *et al.* 2009) y CDK16-CCNI/CCNY/SPY1/CCNYL1 (Mikolcevic *et al.* 2012), lo que valida y da robustez al *screening* realizado. También se detectó la interacción de CCNI con CDK18 observada mediante el análisis del interactoma de cerebro, al contrario de lo que sucede para la posible interacción de CCNG1 con CDK16.

Llama la atención que parece haber cierta “promiscuidad” en algunas ciclinas, especialmente notable en el caso de CCNI y también, aunque en menor medida, en CCNY. Por otro lado, para la mayoría de las ciclinas no se detectó ninguna interacción.

Ante la duda de si esta ausencia de interacciones podría ser debida a una incorrecta expresión, bien de la ciclina, bien de la CDK en las células diploides, se comprobó por WB la expresión de algunas de ellas a partir de colonias procedentes de placa DDO. A modo de ejemplo, en la Figura 12 se muestra la expresión de las proteínas tras el cruce de la cepa AH109 portadora de CNTD2 con la colección de CDKs en la cepa Y187.

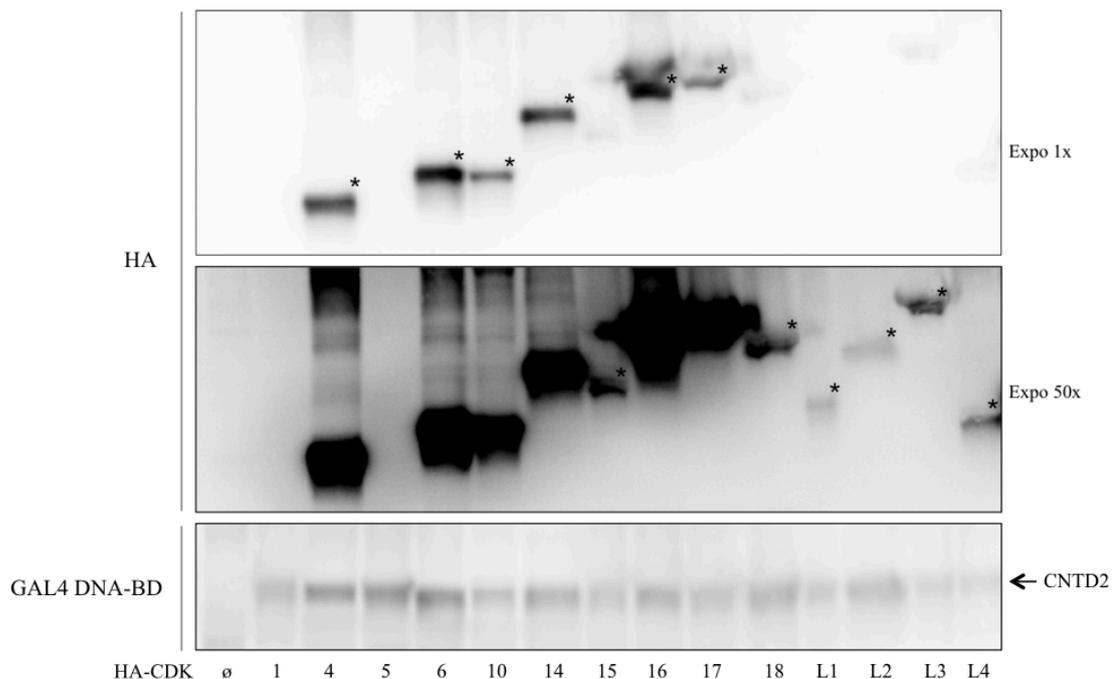


Figura 12 Expresión de CDKs y CNTD2 en células diploides. Se realizó el cruce de células de la cepa AH109 *mat a* portadora de la ciclina CNTD2, con células de la cepa Y187 *mat α* portadoras de las distintas CDKs. Tras la selección de colonias diploides en medio DDO, se evaluó, mediante *immunoblot*, la expresión de las CDKs usando un anticuerpo anti-HA, y de CNTD2 con un anticuerpo anti-GAL4 DNA-BD.

Como se puede observar, la ciclina se expresa en todos los cruces, aunque a unos niveles más bajos que en el caso de las CDKs. Casi todas las CDKs, en mayor o menor grado, también se expresan. Las excepciones son la comentada CDK1, y CDK5. En vista de que

RESULTADOS

en el *screening* (del que realizaron tres replicados) hay, efectivamente, positivos para CDK5, es probable que la ausencia total de expresión que se observa en la Figura 3 sea causa de algún problema técnico de este experimento, como la posible existencia de revertientes en esa placa en concreto.

Confirmación de las interacciones positivas

Para evaluar la capacidad de crecimiento de las células portadoras de estos complejos, se realizaron una serie de *dots* en diferentes tipos de medio, incluyendo el medio DDOX (doble *drop-out* junto con el sustrato X- α -Gal) en el que las colonias adquirirán un color azulado en el caso de la existencia de interacción (Figura 13). De esta forma, se añade un nivel más de selección de verdaderos positivos.

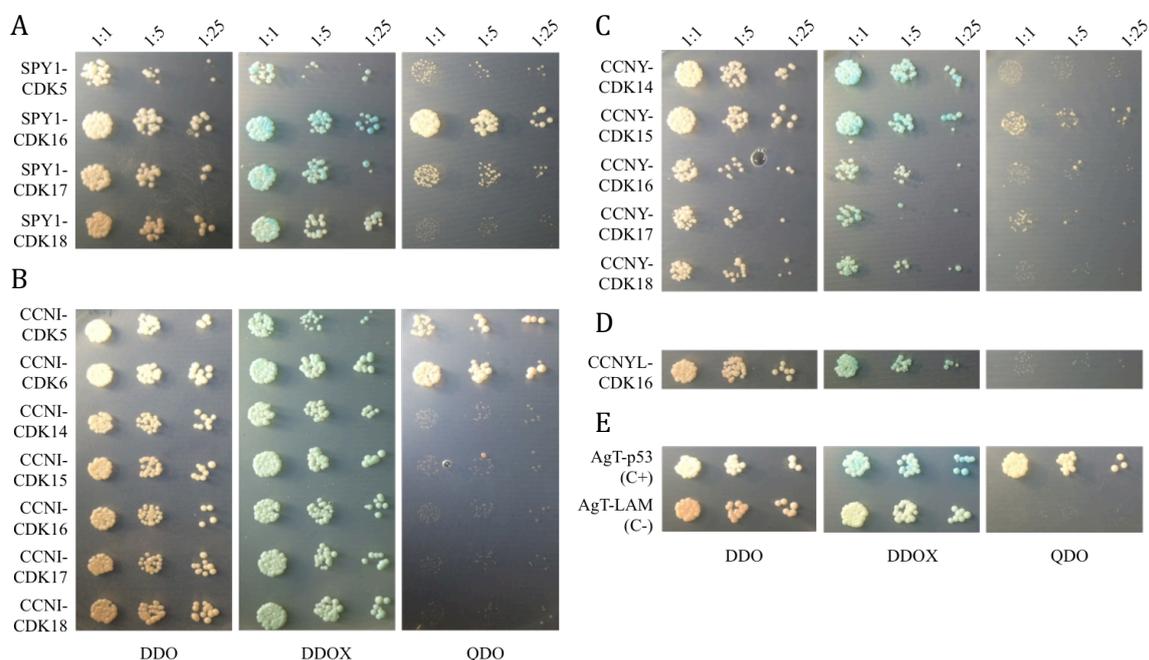


Figura 13. Evaluación de la capacidad de crecimiento mediante *dots*. El desarrollo de colonias en medio DDO indica el correcto *mating* de las cepas. El color azul en medio DDOX y el desarrollo de colonias en medio QDO es indicativo de la interacción entre las dos proteínas. Se muestran las interacciones de SPY1 (A), CCNI (B), CCNY (C) y CCNYL (D) con sus CDKs; también se muestran los controles positivo y negativo (E), así como las diferentes diluciones realizadas para hacer la siembra.

1.2.1 Validación del complejo CDK16-SPY1

A continuación se procedió a realizar una serie de experimentos con el fin de validar la existencia de los nuevos complejos CDK-Ciclina mediante otros métodos de detección de interacciones proteína-proteína. Se escogieron para su validación aquellos complejos que presentaban especial interés: CDK16-SPY1, CDK6-CCNI y CDK16-CCNY.

CDK16 interacciona con SPY1 en extractos celulares

Para estudiar si SPY1 interacciona efectivamente con CDK16 utilizando un método experimental diferente, SPY1 se clonó en el vector de expresión en bacterias pGEX6P1. En este sistema, SPY1 se produce como una proteína de fusión con un GST en el extremo N-terminal. Tras su expresión en *E. coli* BL21 y purificación mediante resina de glutatión-sefarosa, se mantuvo la proteína unida a las esferas de la resina. De esta forma, la resina fue incubada con un extracto celular y posteriormente recuperada con el fin de evaluar si CDK16 se había unido a SPY1.

Este experimento de *trapping* se llevó a cabo inicialmente incubando la purificación de SPY1 con un extracto de la línea celular de glioblastoma U-87. La elección de esta línea celular se hizo en base a la reportada implicación de SPY1 en la tumorigénesis de gliomas (Dorota Lubanska *et al.* 2014) y a la importancia de CDK16 en tejido nervioso (Graeser *et al.* 2002). A pesar de que mediante el anticuerpo anti-SPY1 de que disponemos, la proteína endógena es prácticamente indetectable, se optó por esta línea con el fin de maximizar la similitud con un entorno en el que tanto la presencia de SPY1 como de CDK16 pudiera ser relevante. Paralelamente, se hizo el mismo experimento en un modelo celular diferente, en este caso, con la línea de adenocarcinoma de pulmón A549.

RESULTADOS

Como se puede observar en la Figura 14, CDK16 y SPY1 interactúan *in vitro* al incubarse SPY1 con extractos celulares procedentes de las dos líneas.

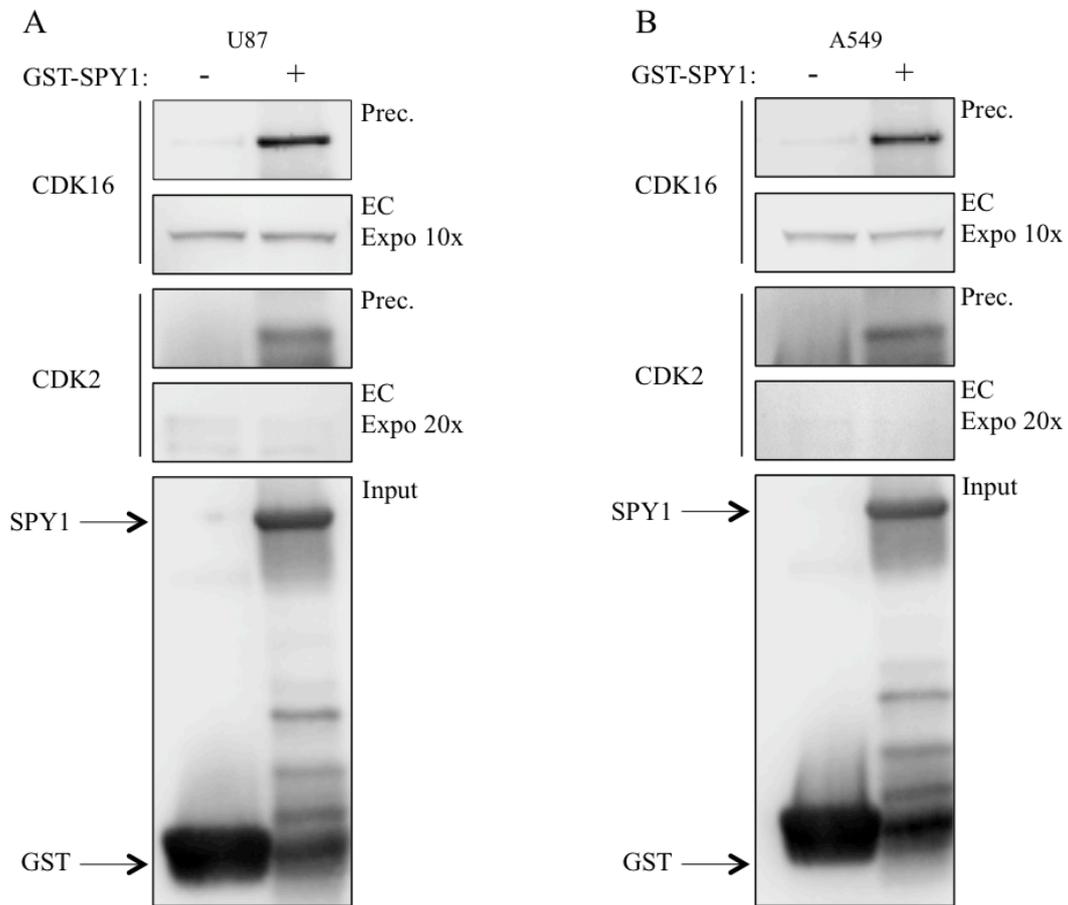


Figura 14. CDK16 interacta con SPY1 *in vitro*. Ensayo de *trapping* sobre extractos de células U87 (A) y A549 (B). El extracto celular fue incubado con GST o GST-SPY1 purificadas de *E. coli*. CDK16 y CDK2 endógenas fueron detectadas en un WB mediante el uso de anticuerpos específicos, mientras que las proteínas recombinantes se siguieron mediante un anti-GST. EC corresponde a un 1,5% de la cantidad de proteína usada para el *trapping*.

Además de la interacción CDK16-SPY1, y a pesar de la baja expresión de CDK2 en estas líneas, también se detectó la interacción con SPY1 previamente reportada por el grupo de Porter (Porter *et al.* 2002).

CDK16 interacciona con SPY1 *in vivo*

Esta interacción también se quiso demostrar *in vivo*. Por ello se llevó a cabo una Co-IP a partir de extractos de células que sobreexpresan SPY1 (Figura 15).

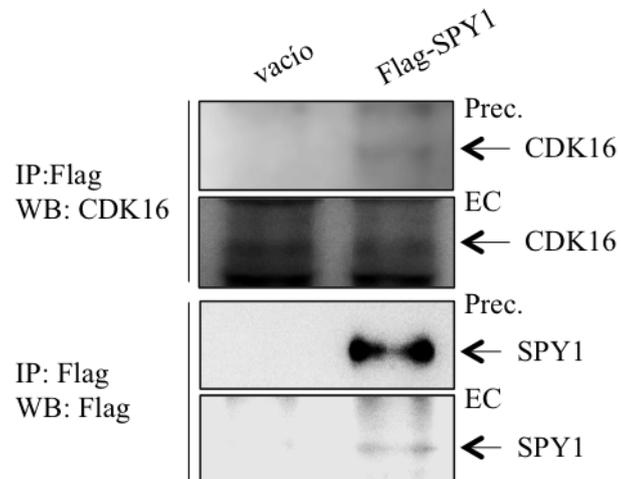


Figura 15. CDK16 interacciona con SPY1 *in vivo*. Células Hek293T fueron transfectadas con el vector de expresión pIRES2eGFP vacío o pIRES2eGFP-Flag-SPY1. A las 48 h. de la transfección, el extracto celular fue sometido a IP usando un anticuerpo anti-Flag. La interacción con CDK16 fue analizada mediante WB usando un anticuerpo anti-CDK16. EC corresponde a un 0,6% de la cantidad de proteína usada para la IP.

Se escogieron células Hek293T debido a su elevada tasa de transfección, ya que tal y como se ha descrito, los niveles de SPY1, a pesar de la sobreexpresión, suelen ser pobres (Dinarina, Santamaria, y Nebreda 2009). En la Figura 15 se observa que esto también sucede en nuestro caso.

En la misma figura puede comprobarse que CDK16 interacciona con SPY1 también con esta aproximación experimental. Es así que esta pareja CDK-Ciclina ha sido detectada mediante tres métodos diferentes.

CDK16-SPY1 forman un complejo activo

A continuación, se quiso comprobar si estos nuevos complejos tienen, en efecto, actividad *in vitro*. Para ello, las diferentes proteínas fueron expresadas en *E. coli* BL21 con un GST en N-terminal, para su posterior purificación mediante una columna de glutatión-sefarosa. Tras la elución, las proteínas purificadas fueron sometidas a una gel filtración con el fin de excluir agregados proteínicos.

Los ensayos de fosforilación *in vitro* se llevaron a cabo siguiendo la estrategia descrita por el grupo de Shokat (Blethrow *et al.* 2008). Este sistema utiliza un ATP con una modificación consistente en una sustitución tiol en el fosfato gamma (ATP- γ -S). La quinasa transferirá el tiofosfato a sus sustratos, de forma que éstos podrán ser detectados mediante el uso de un anticuerpo específico anti-éster tiofosfato (ver *Materiales y Métodos*).

El ensayo quinasa *in vitro* que se presenta en la Figura 16 muestra que CDK16 es capaz de fosforilar a SPY1.



Figura 16. CDK16 fosforila a SPY1 (A) y se autofosforila en presencia de la misma (B) *in vitro*. GST-CDK16 y GST-SPY1 fueron purificadas de *E. coli* y sometidas a una gel filtración. Las proteínas purificadas fueron utilizadas en un ensayo de fosforilación *in vitro* y posteriormente sometidas a WB. La fosforilación se detectó mediante la utilización de un anticuerpo anti-éster tiofosfato (ver *Materiales y métodos*), mientras que la proteína total fue seguida mediante un anti-GST.

También se observa una banda de fosforilación en el peso correspondiente a CDK16. Dado que mediante el uso del anti-éster tiofosfato, sólo deberían detectarse aquellas fosforilaciones que han tenido lugar durante el ensayo, se quiso comprobar que no se trataba de una banda inespecífica correspondiente a un epítipo reconocible por el anticuerpo pero formado *in vivo*. Para ello se realizó el mismo ensayo pero incluyendo una reacción con todos los componentes a excepción de SPY1 (Figura 16B). Tal y como se puede apreciar, cuando SPY1 está ausente, esta banda desaparece, indicando que la fosforilación tiene lugar *in vitro* durante el ensayo.

Cabe destacar que estos ensayos se han realizado en ausencia de CAK (del inglés *CDK Activating Kinase*). Esto concuerda con los datos publicados para CDK2-SPY1 que muestran que la quinasa no requiere fosforilación activadora previa para formar un complejo activo con SPY1 (Karaiskou *et al.* 2001).

1.2.2 Validación del complejo CDK6-CCNI

CDK6 interacciona con CCNI en extractos de cerebro

La posible existencia de una pareja CDK6-CCNI despierta especial interés al ser CDK6 una CDK canónica, con funciones directamente relacionadas con la regulación del ciclo celular y con un papel relevante en cáncer.

Es interesante que, tal y como se muestra en el ensayo Y2H (Figura 13), el crecimiento de las células portadoras de la pareja CDK6-CCNI parece incluso mayor a aquel observable para la previamente descrita pareja de CCNI, CDK5.

Para confirmar esta interacción mediante otro sistema, se optó por llevar a cabo la estrategia del *trapping*. En este caso, en lugar de un extracto celular, se optó por utilizar un extracto de cerebro de rata, ya que es en este tejido donde hemos conseguido detectar los mayores niveles de CCNI.

RESULTADOS

De la misma forma que en el caso de SPY1, CCNI fue expresada y purificada a partir de *E. coli*, mantenida en las bolas de glutatión-sefarosa, e incubada con un extracto de cerebro de rata. La Figura 17 muestra que CDK6 precipita con GST-CCNI, y no con el GST solo usado como control negativo.

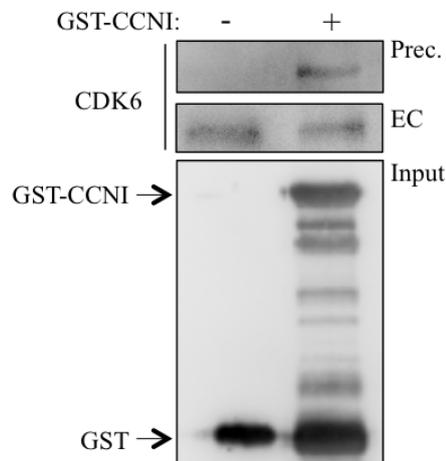


Figura 17. CDK6 interacciona con CCNI *in vitro*. Ensayo de *trapping* sobre un extracto de cerebro de rata. El extracto fue incubado con GST o GST-CCNI purificadas de *E. coli*. CDK6 fue detectada en un WB mediante el uso de un anticuerpo específico, mientras que las proteínas recombinantes se siguieron mediante un anti-GST. EC corresponde a un 0,6% de la cantidad de proteína usada para el *trapping*.

A pesar de la existencia de interacción entre CDK6 y CCNI, no ha sido posible demostrar la actividad de dicho complejo. Esto puede deberse a que las condiciones de la purificación o del ensayo *in vitro* no son las adecuadas, o a que el complejo no es, en efecto, activo.

1.2.3 Validación del complejo CDK16-CCNY

CDK16 interacciona con CCNY *in vivo*

En el caso de CDK16 y CCNY, la validación de su interacción se hizo mediante una IP de las proteínas endógenas.

Un extracto de células Hek293 fue incubado con anticuerpos específicos de CDKs. Se utilizó un anti-PSTAIRES con el fin de inmunoprecipitar aquellas CDKs que contienen esta secuencia (CDK1, CDK2 y CDK3), un anti-CDK5 y un anti-CDK16. La Figura 18 muestra la interacción entre CDK16 y CCNY. Se aprecia también que no hay Co-IP de CCNY con las PSTAIRES, mientras que con CDK5 parece existir cierto nivel de interacción no detectada mediante el ensayo de Y2H.

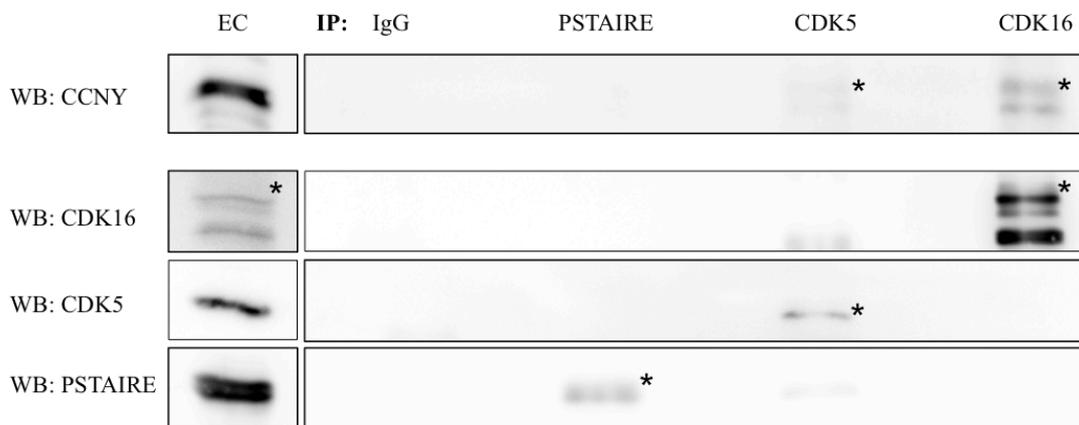


Figura 18. CDK16 interacciona con CCNY *in vivo*. Un extracto de células Hek293 fue utilizado para inmunoprecipitar las CDKs endógenas indicadas mediante el uso de anticuerpos específicos. El control negativo se realizó usando una inmunoglobulina no inmunógena. La interacción con CCNY fue analizada mediante WB usando un anticuerpo anti-CCNY. Las CDKs fueron detectadas con los mismos anticuerpos que se usaron para la IP. La banda correspondiente a la isoforma canónica de CDK16 aparece señalada con un asterisco. EC corresponde a un 1% de la cantidad de proteína usada para la IP.

CDK16-CCNY forman un complejo activo

La actividad de la pareja CDK16-CCNY fue confirmada usando proteínas recombinantes purificadas de *E. coli*. Como se puede ver en la Figura 19, CDK16 también fosforila a CCNY.

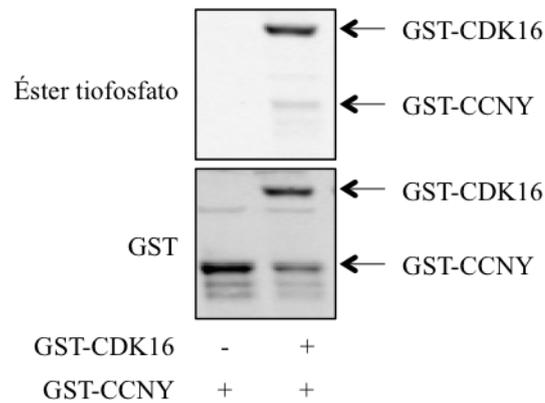


Figura 19. CDK16 fosforila a CCNY *in vitro*. GST-CDK16 y GST-CCNY fueron purificadas de *E. coli* y sometidas a una gel filtración con el fin de excluir agregados de proteínas. Las proteínas purificadas fueron utilizadas en un ensayo de fosforilación *in vitro* en presencia de ATP- γ -S, y posteriormente sometidas a WB. La fosforilación se detectó mediante la utilización de un anticuerpo anti-éster tiofosfato, mientras que la proteína total fue seguida mediante un anti-GST.

Esta fosforilación de CCNY también es independiente de CAK, y al contrario de lo que sugieren otros estudios, tampoco requiere la unión de una proteína 14-3-3. (Shehata *et al.* 2015).

Al igual que en el caso de CDK16-SPY1 (Figura 16), se puede observar que existe una banda de fosforilación correspondiente a CDK16, lo que sugiere que CDK16 es capaz de auto-fosforilarse cuando se encuentra en presencia de una ciclina.

PARTE 2
**SUSTRATOS DE LOS NUEVOS COMPLEJOS CDK-CICLINA:
IDENTIFICACIÓN DE SUSTRATOS DEL COMPLEJO CDK16-CCNY EN
CÉLULAS TUMORALES**

A pesar de que la interacción entre CDK16 y CCNY fue descrita por otro grupo poco antes del inicio de este trabajo (Mikolcevic *et al.*, 2012), lo cierto es que hasta el momento no se ha reportado ningún sustrato específico del complejo. Por otra parte, durante el desarrollo de este trabajo, se publicaron diversos estudios en que se revelaba la implicación de CCNY en diferentes tipos de cáncer (Y. Xu *et al.* 2009; Yue *et al.* 2011; T. Sun, Co, y Wong 2014; Yan *et al.* 2016; Haiyuan Liu *et al.* 2016). Todo ello indicó que sería interesante encontrar sustratos de CCNY y, a diferencia del apartado anterior, se decidió buscarlos en extractos de líneas tumorales.

Los eventos de fosforilación normalmente constituyen procesos dinámicos y transitorios. Esto hace que sea complicado detectar sustratos directos de una quinasa. Con el fin de sortear este problema, se siguieron, en paralelo, dos estrategias para la búsqueda de sustratos de CDK16 (Figura 20). El primero de ellos fue íntegramente ejecutado por mí, el segundo fue realizado mayoritariamente por Sara Hernández (Hernández-Ortega *et al.*, manuscrito en preparación); ambas aproximaciones son descritas a continuación.

La primera de las aproximaciones está basada en el hecho de que la especificidad de sustrato en un complejo CDK-Ciclina viene determinada por la propia ciclina. Tiene sentido entonces pensar que si el potencial sustrato interacciona no sólo con la CDK, sino con el complejo en sí, el mismo podría ser detectado a través de su interacción con la ciclina.

Por otro lado, la segunda aproximación, se basa en la técnica descrita por el grupo de Shokat (Blethrow *et al.* 2008; Hertz *et al.* 2010), mediante la cual se generó una CDK16 análogo-específica (AS). Una mutación puntual en el residuo *gatekeeper* (“controlador de acceso”) del sitio activo de la quinasa, provoca una expansión del sitio de unión del ATP. Esto permite a la quinasa AS aceptar un análogo de ATP, modificado en la posición N⁶ (feniletil-ATP), que no podrá ser usado por las quinasas WT (forma salvaje, del inglés

RESULTADOS

Wild Type). Dicho feniletíl-ATP posee una segunda modificación consistente en una sustitución tío en el fosfato gamma (Figura 20 C). De esta forma, cuando la quinasa AS fosforila a sus sustratos, éstos quedan marcados con un tiofosfato y pueden ser capturados mediante una resina de iodoacetil-sefarosa.

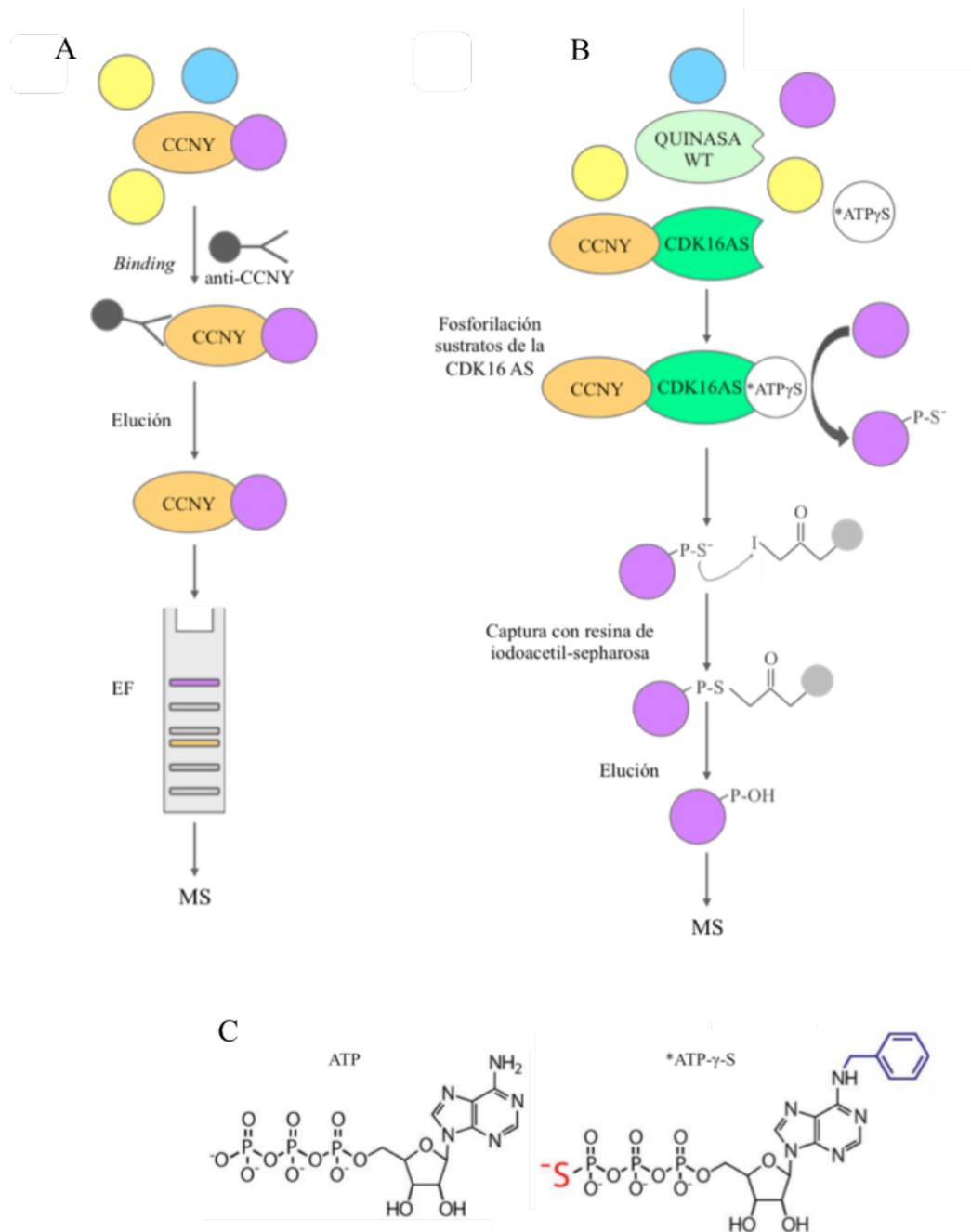


Figura 20. Estrategias para la identificación de sustratos del complejo CDK16-CCNY. Se llevaron a cabo dos estrategias diferentes: A) identificación de interactores de CCNY; y B) identificación de sustratos específicamente fosforilados por CDK16 (esta segunda estrategia fue diseñada y ejecutada por la Hernández Ortega – resultados no publicados-). C) Estructuras moleculares del ATP y del feniletíl-ATP- γ -S (en rojo se muestra la modificación en el fosfato gamma, y en azul la del N⁶. Obtenido de Blethrow *et al.* 2008).

2.1 Identificación de interactores de CCNY

La identificación de interactores de CCNY se llevó a cabo mediante IP de la proteína endógena a partir de extractos de la línea celular de cáncer de mama MCF7. Los inmunoprecipitados fueron enviados al servicio de proteómica para su análisis.

Estos experimentos se llevaron a cabo bajo dos condiciones diferentes de cantidad de detergente (1% o 0.2%; ver Materiales y Métodos); de cada una de las condiciones se realizaron tres experimentos independientes. En paralelo se realizaron también inmunoprecipitaciones de CCNA2 con el fin de incluir un control positivo.

En la Tabla 12 se muestran las proteínas identificadas como interactores de CCNY. Se seleccionaron sólo aquellas proteínas que se detectaron en al menos dos de los tres experimentos realizados para cada condición, y no detectados en el control negativo o que aparecen con una intensidad $\geq 4,5$ (Log2) en CCNY respecto al control negativo. La Tabla 13 muestra los interactores de CCNA, seleccionados bajo el mismo criterio que en el caso anterior.

RESULTADOS

Tabla 12. Interactores de CCNY. En azul se muestran las proteínas detectadas bajo la condición de 1% de detergente; en rojo se muestran las detectadas en la condición de 0.2% de detergente; en verde se muestran las detectadas con las dos condiciones.

SÍMBOLO	NOMBRE	Log2 (CCNY/CN)	Nº péptidos únicos
CDKN2AIP	CDKN2A-interacting protein	Sólo CCNY	11
CEP131	Centrosomal protein of 131 kDa	Sólo CCNY	9
PACS2	Phosphofurin acidic cluster sorting protein 2	Sólo CCNY	6
TERF2	Telomeric repeat-binding factor 2	Sólo CCNY	3
TERF2IP	Telomeric repeat-binding factor 2-interacting protein 1	Sólo CCNY	2
WDR37	WD repeat-containing protein 37	Sólo CCNY	2
ZCCHC8	Zinc finger CCHC domain-containing protein 8	Sólo CCNY	2
UTP15	U3 small nucleolar RNA-associated protein 15 homolog	Sólo CCNY	2
RBM7	RNA-binding protein 7	Sólo CCNY	1
FIP1L1	Pre-mRNA 3-end-processing factor FIP1	Sólo CCNY	1
PCNT	Pericentrin	9,73	146
PRC1	Protein regulator of cytokinesis 1	9,70	20
CCNYL1	Cyclin-Y-like protein 1	8,75	10
TJP1	Tight junction protein ZO-1	7,96	21
HSPBAP1	Isoform 2 of HSPB1-associated protein 1	5,97	1
PACSIN2	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 2	5,60	5
GOLGB1	Golgin subfamily B member 1	5,53	17
MYO1D	Unconventional myosin-Id	5,39	28
YY1; YY2	Transcriptional repressor protein YY1; Transcription factor YY2	4,78	3
CDC42BPG	Serine/threonine-protein kinase MRCK gamma	4,73	14
PPP1R12A	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A	4,67	12
MRPL46	39S ribosomal protein L46, mitochondrial	4,67	7
SPECC1L	Cytospin-A	4,61	17

Tabla 13. Interactores de CCNA. En azul se muestran las proteínas detectadas bajo la condición de 1% de; en rojo se muestran las detectadas en la condición de 0.2% de; en verde se muestran las detectadas con las dos condiciones.

SÍMBOLO	NOMBRE	Log2 (CCNA/CN)	Nº péptidos únicos
RBL1	RB transcriptional corepressor like 1	Sólo CCNA	10
CDKN1A	Cyclin dependent kinase inhibitor 1A	Sólo CCNA	7
CDKN1B	Cyclin dependent kinase inhibitor 1B	Sólo CCNA	5
SOGA1	Supressor of glucose, autophagy associated 1	Sólo CCNA	5
ATG16L1	Autophagy related 16 like 1	Sólo CCNA	4
E2F4	E2F transcription factor 4	Sólo CCNA	3
NACC1	Nucleus accumbens associated 1	Sólo CCNA	2
ARHGEF1	Rho guanine nucleotide exchange factor 1	Sólo CCNA	2
SKP2	S-phase kinase associated protein 2	Sólo CCNA	2
ATG5	Autophagy related 5	Sólo CCNA	1
SF1	Splicing factor 1	Sólo CCNA	1
CDK2	Cyclin dependent kinase 2	8.6	20
RBL2	RB transcriptional corepressor like 2	8.3	19
HMOX2	Heme oxigenase 2	8.3	13
CDK1	Cyclin dependent kinase 1	7.6	14
CORO1B	Coronina 1B	6.5	15
TAOK3	TAO kinase 3	5.5	16
CREB1	cAMP responsive element binding protein 1	5.3	2

2.2 Identificación de sustratos específicamente fosforilados por CDK16

CDK16WT, CDK16AS y CCNY, clonadas en el vector pGEX6P1, se purificaron desde *E. coli* tal y como se ha explicado anteriormente. Un extracto de células HeLa se incubó con CCNY a solas, o junto con CDK16WT o CDK16AS. A estas reacciones de añadió una mezcla de ATP normal y del análogo (*ATP- γ -S en la Figura 20). Sólo la quinasa AS será capaz de usar el análogo, transfiriendo el tiofosfato a sus sustratos, que

RESULTADOS

quedarán por tanto marcados específicamente. Estas proteínas tio-fosforiladas son digeridas con tripsina, y los péptidos resultantes capturados en una resina de iodoacetil-sefarosa para su posterior análisis mediante espectrometría de masas. La Tabla 14 contiene proteínas detectadas con la combinación CDK16AS-CCNY y no con CDK16WT o CCNY a solas con una puntuación (Best Score) ≥ 50 .

Tabla 14. Sustratos fosforilados por CDK16.

SÍMBOLO	NOMBRE	Best Score	Nº péptidos únicos
NUCKS1	Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinase substrate 1	95.4	4
CCNY	Cyclin-Y	76.2	13
UNG	Uracil-DNA glycosylase	74.8	1
FAM195A	Protein FAM195A	73.8	1
DNMT1	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	71.7	1
PHLDB2	Pleckstrin homology-like domain family B member 2	70.6	2
MYCBP2	Probable E3 ubiquitin-protein ligase MYCBP2	66.0	2
TPX2	Targeting protein for Xklp2	65.0	1
EEF2	Elongation factor 2	63.9	6
BCAR3	Breast cancer anti-estrogen resistance protein 3	62.1	1
XRCC1	DNA repair protein XRCC1	59.7	2
NUP35	Nucleoporin NUP53	57.5	1
ABL1	Tyrosine-protein kinase ABL1	57.3	1
ERC1	ELKS/Rab6-interacting/CAST family member 1	56.6	3
LARP1	La-related protein 1	55.6	3
PRC1	Protein regulator of cytokinesis 1	55.2	3
RTN3	Reticulon-3	55.2	1
BOD1L1	Biorientation of chromosomes in cell division protein 1-like 1	53.6	3
KIF21A	Kinesin-like protein KIF21A	52.0	2
CEP170	Centrosomal protein of 170 kDa	50.3	3
ABL2	Abelson tyrosine-protein kinase 2	50.2	1

2.3. La proteína PRC1 interacciona con CCNY y es fosforilada por CDK16

Tras aplicar los filtros de cada una de las estrategias, se observa que PRC1 fue detectada mediante ambas. PRC1 (*Protein Regulator of Cytokinesis 1*) es crítica para la organización de los microtúbulos (Subramanian *et al.* 2010) y es esencial para una correcta citocinesis (Neef *et al.* 2007). Además, recientemente se ha demostrado su participación en la vía de señalización de Wnt/ β -catenina, promoviendo efectos oncogénicos en carcinoma hepatocelular (Chen *et al.* 2016).

El papel de PRC1 en citocinesis está determinado por la correcta actividad del complejo CDK1-CCNB1 (Voets *et al.* 2015), que fosforila a PRC1 de forma que se impide su unión prematura a la quinasa PLK1, lo que provocaría un bloqueo mitótico (Neef *et al.* 2007). Se decidió investigar la actividad de la pareja CDK16-CCNY sobre PRC1, ante la posibilidad de que no todos los efectos de PRC1 vengan determinados exclusivamente por la actividad del complejo CDK1-CCNB1.

2.4 PRC1 es fosforilada por el complejo CDK16-CCNY *in vitro*

Con el fin de demostrar que PRC1 es fosforilada por CDK16 en presencia de CCNY, PRC1 se clonó también en un pGEX6P1 para su expresión y purificación a partir de *E.-coli*. En un primer momento se quiso valorar la actividad del complejo respecto a la de la pareja CDK1-CCNB1, la cual fue adquirida como complejo activo. Como se puede observar en Figura 21A, PRC1 es fosforilada por ambos complejos, aunque con menos intensidad en el caso de CDK16-CCNY.

RESULTADOS

Además, mediante mutagénesis dirigida se construyó una PRC1 en que la Thr481, el sitio de fosforilación detectado en el análisis por espectrometría de masas con la estrategia de la CDK16AS, fue sustituida por Ala, generándose así un mutante no fosforilable. De esta forma, se pudo comparar la fosforilación por CDK16 en las dos versiones de la proteína (Figura 21B). En el carril correspondiente a PRC1-Ala se puede observar una débil señal compatible con una fosforilación residual. PRC1 tiene otro sitio de fosforilación para CDK1 (Thr470); sería conveniente realizar un ensayo quinasa con ese otro mutante no fosforilable con el fin de averiguar si los dos sitios son fosforilados por CDK16.

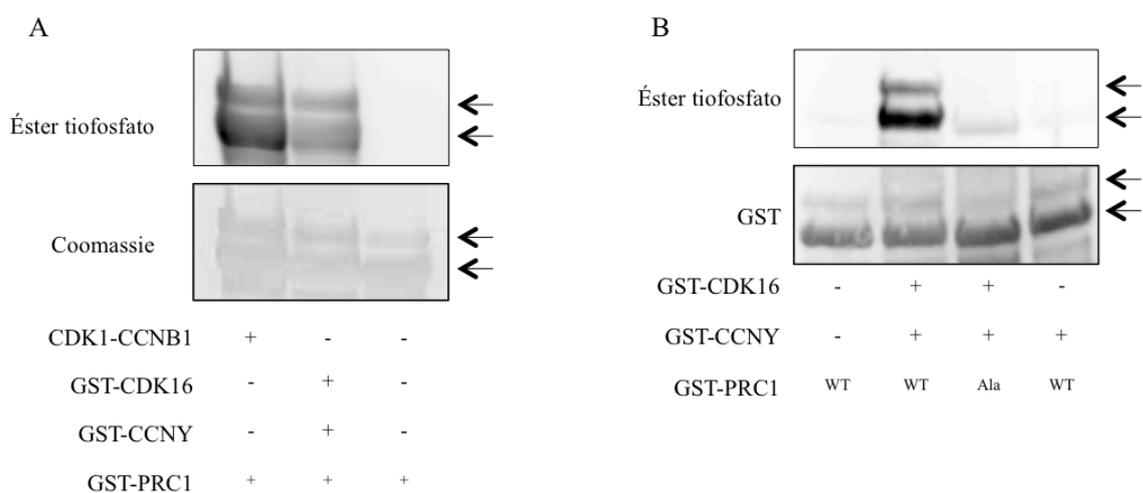


Figura 21. CCNY activa a CDK16 *in vitro*. A) CDK16 fosforila a PRC1 con menor intensidad que el complejo CDK1-CCNB1. B) El mutante no fosforilable PRC1-Ala es prácticamente no fosforilado por CDK16. GST-CDK16, GST-CCNY y GST-PRC1 WT o Ala (mutante no fosforilable) fueron purificadas de *E. coli* y sometidas a una gel filtración con el fin de excluir agregados de proteínas; el complejo activo CDK1-CCNB1 es comercial (ver Materiales y Métodos). Estas proteínas fueron utilizadas en un ensayo de fosforilación *in vitro* en presencia de ATP- γ -S, y posteriormente sometidas a WB. La fosforilación se detectó mediante la utilización de un anticuerpo anti-éster tiofosfato, mientras que la proteína total fue seguida mediante tinción de la membrana con Coomassie o anti-GST.

Actualmente otros investigadores del grupo están analizando la relevancia que este complejo, a través del sustrato PRC1, podría tener en diferentes modelos celulares de cáncer. Disponer de la herramienta del CDK16AS permitirá atribuir los efectos a esta nueva pareja, distinguiéndolos de aquellos que pudieran estar determinados por CDK1-CCNB1.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El trabajo que aquí se presenta tiene la finalidad de ser un punto de partida para el estudio de las redes de interacción en que participan las nuevas CDKs y las ciclinas atípicas. Es por ello que el objetivo principal de este estudio es la definición de nuevas parejas CDK-Ciclina y, al mismo tiempo, la identificación de otros interactores de las ciclinas atípicas que puedan ayudar a dilucidar en qué procesos biológicos participan estas proteínas.

Durante el desarrollo del estudio, surgió un conflicto en cuanto a la nomenclatura de las ciclinas objeto del mismo que merece ser aclarado.

Las diferentes ciclinas se han dividido clásicamente en dos grupos: las ciclinas de ciclo celular, y las ciclinas de transcripción. Tras el descubrimiento de otras proteínas poseedoras también de una caja de ciclina, de las que se desconocía su función, estas empezaron a ser denominadas “nuevas ciclinas”. Aquellas nuevas ciclinas para las que no se conocía CDK eran a su vez llamadas “ciclinas *orphan*”. Pero ambos términos, “nuevas” y “*orphan*”, presentan desventajas al ser usados como clasificatorios de las ciclinas, ya que ambos son atributos variables. Las ciclinas (o cualquier proteína) pueden ser nuevas durante un tiempo, pero ¿cuánto tiempo? Después de casi veinte años, ¿las nuevas ciclinas siguen siendo nuevas? (Murray y Marks 2001). En cuanto a las ciclinas *orphan*, se las denomina así porque se presupone que interaccionan con una CDK, pero tal vez no sea el caso, como sucede con CCNF (Lu, Liu, y Legerski 2009). Por otro lado, si resulta que sí forman complejos con CDKs, en el momento en que éstas sean identificadas, las ciclinas dejarán de ser *orphan*, de la misma forma que sucedió, por ejemplo, con CDK14-CCNY (Jiang *et al.* 2009).

Por estos motivos, a lo largo de este trabajo se ha optado por denominar “ciclinas atípicas” a aquellas que han sido objeto del mismo. A excepción de CCNJ, CCNJL y CCNO, estas ciclinas cumplen el criterio de tener una única caja de ciclina y, en general, están poco caracterizadas y sus funciones no están del todo dilucidadas.

NUEVOS INTERACTORES DE LAS CICLINAS ATÍPICAS

A través de los ensayos de *trapping* no fue posible identificar con seguridad ninguna CDK asociada a ciclinas atípicas, sin embargo, mediante esta estrategia sí fueron identificados interactores de las mismas no descritos previamente y que paso a discutir a continuación:

CCNG1-PURA

Una de las interacciones que merecería ser estudiada es la de CCNG1 con PURA. PURA es una proteína de unión a DNA y RNA que ejerce diferentes funciones en las células, participando en diversos procesos como la replicación, la transcripción y la traducción (Gallia, Johnson, y Khalili 2000) y es esencial para el desarrollo y diferenciación neuronal (Khalili *et al.* 2003; Hokkanen *et al.* 2012). Llamativamente, se ha propuesto que PURA podría tener funciones directamente relacionadas con el control de la proliferación, ya que es capaz de interactuar con proteínas como pRb (Johnson *et al.* 1995) y con diversas CDKs y ciclinas, como CDKs 1, 2 y 4 y ciclinas A, B1, D1, E1 y H (Hong Liu *et al.* 2005). Sería de gran interés explorar la posible regulación mediante ciclinas o complejos CDK-Ciclina de los procesos en que interviene PURA.

CCNG1-ERC2

ERC2 es una proteína implicada en el tráfico vesicular en la zona activa de las sinapsis (Jaewon Ko *et al.* 2003). En *C. elegans*, los complejos equivalentes a CDK5-p35 y CDK16-CCNY son necesarios para el correcto tráfico vesicular neuronal y la correcta formación y eliminación de neuritas en el desarrollo neuronal (Park *et al.* 2011; Ou *et al.* 2010). Si otros complejos CDK-Ciclina están implicados también este proceso es algo susceptible de ser objeto de estudio. La posible relevancia de la interacción de ERC2 con CCNG1 en cáncer es algo que quedaría por determinar.

CNTD2-MED23

Es especialmente interesante la interacción entre el componente del Complejo Mediador MED23 y la poco caracterizada CNTD2. Datos recientemente publicados por nuestro grupo muestran que localiza principalmente en núcleo (Gasa *et al.* 2017). Según este estudio, la cantidad de proteína se encuentra aumentada en tejido tumoral de pulmón en pacientes con carcinoma de células no pequeñas (NSCLC), en relación a tejido sano adyacente. Además, la sobreexpresión ectópica de CNTD2 en células tumorales de pulmón produce un aumento de la viabilidad de las mismas y promueve su migración. También induce el crecimiento tumoral en xenoinjertos en ratón. Todo esto hace pensar que CNTD2 es un factor de malignidad importante en cáncer de pulmón. MED23 también tiene una expresión aumentada en muestras de NCSLC y, del mismo modo que CNTD2, promueve la proliferación y migración de células tumorales de pulmón (Shi, Liu, *et al.* 2014). La localización principalmente nuclear de CNTD2 podría ser indicativo de su posible implicación en la regulación de la transcripción, al igual que sucede para otras ciclinas. En vista de que hasta el momento no ha sido identificada ninguna CDK que forme complejo con CNTD2, queda por determinar si las funciones de esta ciclina son o no dependientes de CDK.

La validez de las interacciones detectadas en estos experimentos, demostrada por el hecho de que las tres que se escogieron para su confirmación fueron, efectivamente validadas, abre la puerta, tal y como se pretendía, a futuras líneas de investigación, en las que se puedan estudiar en profundidad las implicaciones que las interacciones descritas puedan tener en diversos procesos celulares.

NUEVOS COMPLEJOS CDK-CICLINA

Con el fin de identificar nuevos complejos CDK-Ciclina, se siguieron dos estrategias en paralelo: ensayos de *trapping* acoplados a espectrometría de masas y un ensayo de Y2H.

Tal y como se ha expuesto previamente, mediante los ensayos de *trapping* y el posterior análisis por espectrometría de masas no se consiguieron identificar CDKs asociadas a las ciclinas CCNI, CNTD2, CCNG1 o CCNG2, a pesar de que la técnica es válida para la detección de otras interacciones. Existen diversos motivos que podrían explicar este hecho. En primer lugar, en análisis mediante espectrometría de masas presenta importantes limitaciones para la detección de proteínas poco abundantes. A pesar de que el cerebro es el tejido donde más se expresa CDK5 (Tsai *et al.* 1993), y su asociación con CCNI ha sido previamente descrita, esta interacción no ha sido detectada mediante el sistema que aquí se presenta. Esto podría deberse a que estamos ante una proteómica no dirigida, en la que el elevado rango dinámico de las muestras hace muy complicada la detección de aquellas proteínas que no sean especialmente abundantes.

En este sentido, cabe destacar que en el transcurso del desarrollo de esta tesis varios han sido los laboratorios que han intentado descubrir nuevas parejas CDK/ciclina mediante espectrometría de masas, pero que tampoco han tenido éxito en la identificación de ciclinas asociadas a CDKs. En un estudio publicado por Yang *et al.* en que se analiza el interactoma de CDK9, no se consiguió detectar ninguna ciclina asociada, a pesar de que las interacciones habían sido previamente fijadas mediante *crosslinking* (J. Yang *et al.* 2015). Por otra parte, otro estudio que investigaba el interactoma de todas las CDKs y CDKs en las líneas celulares Hek293T y MCF10A evidencia la importancia del modelo celular con que se trabaje, ya que muestra importantes diferencias entre las proteínas detectadas en cada línea celular. Dicho estudio además pone de nuevo de manifiesto la dificultad para detectar interactores tanto de las nuevas CDKs como de las ciclinas atípicas: en células Hek293 sólo se detectaron las interacciones de CDK5 con CCNI y CABLES1 y 2, mientras que en las células MCF10A solamente se detectó la unión de CCNB3 con CDK15 en MCF10A; para el resto de nuevas CDKs no fue posible encontrar ninguna ciclina asociada en ninguna de las dos líneas celulares. Por último, en cuanto a las ciclinas atípicas, un amplio estudio proteómico realizado en el laboratorio de Chen solo logró detectar a CCNJ en asociación con CDK2 en Hek293T (S. Xu *et al.* 2014).

Estos datos parecen indicar que los complejos CDK-Ciclina en que intervienen estas proteínas o bien son muy poco abundantes, o bien están mantenidos por uniones muy débiles. Esto haría que la espectrometría de masas no fuera el método más adecuado para detectar interacciones entre estas proteínas. Se trata de una tecnología que, con el fin de evitar falsos positivos, requiere unas condiciones que tal vez sean demasiado restrictivas como para permitir el mantenimiento de complejos en que intervengan las nuevas CDKs y ciclinas atípicas. De hecho, si se hace una búsqueda en la base de datos de interacciones IntAct (<http://www.ebi.ac.uk/intact/>), se puede observar que, a fecha de hoy, son muy pocas las interacciones entre ciclinas atípicas y CDKs que han podido ser detectadas mediante espectrometría de masas.

Debido a estas limitaciones que ya preveía, se decidió llevar a cabo de forma paralela un ensayo de Y2H. Esta técnica se ha mostrado exitosa en la detección de interacciones entre ciclinas atípicas y CDKs, tal y como demuestra el estudio hecho por el grupo de Stephan Geley en que se enfrentó CDK16 a una genoteca de cDNA (Mikolcevic *et al.* 2012). El trabajo de esta tesis es el primero en utilizar esta técnica en un *screening* dirigido a la detección específica de interacciones entre ciclinas atípicas y CDKs. Tal y como se expone en los resultados, un total de 17 interacciones fueron detectadas; de las mismas, 7 habían sido previamente identificadas mediante un ensayo de Y2H en el caso de CDK14-CCNY y CDK16-SPY1/CCNI/CCNY/CCNYL1 (Mikolcevic *et al.* 2012; Jiang *et al.* 2009) o IP seguida de WB para CDK5-SPY1 y CDK5-CCNI (Dinarina *et al.* 2005; Brinkkoetter *et al.* 2009), lo que valida el sistema y permite confirmar que se trata de una técnica adecuada para la detección de interacciones entre CDKs y ciclinas atípicas.

Que de un total de 195 combinaciones, tan solo se hayan detectado las mencionadas 17 interacciones, a pesar de tratarse de proteínas sobreexpresadas forzadas a dirigirse al mismo compartimento celular, es indicativo de la especificidad del sistema; es decir: no parece que sea cierta del todo la idea de que la presencia de una caja de ciclina es requerimiento suficiente para que la proteína que la posee interaccione con un dominio PSTAIRE (o su equivalente en otras CDKs). Otra explicación a lo que podría ser una baja cantidad de interacciones detectadas sería que, simplemente, las posibles CDKs de nuestras ciclinas no estuvieran incluidas en el estudio; es posible que algunas de las ciclinas atípicas testadas formen complejos con CDKs de transcripción. Tampoco hay que olvidar la existencia de funciones de las ciclinas independientes de su asociación con CDKs, como los efectos inhibitorios de CCND3 en la diferenciación de células mieloides (Peterson *et*

DISCUSIÓN

al. 2005) o los de CCND1 en la proliferación celular y en *anoikis* (Iwatani, Fujimoto, y Ito 2010; Gan *et al.* 2009). Además, los dominios de ciclina también se encuentran presentes en otras proteínas, como el factor de transcripción TFIIB y la proteína del restinoblastoma, y ambos actúan sin la presencia de ninguna CDK.

Si bien por un lado llama la atención que no hayamos detectado interacciones para la mayoría de las ciclinas atípicas, por otro, es sorprendente la promiscuidad que presentan determinadas ciclinas. En efecto, tal y como se mencionó en la introducción, es frecuente observar que una sola CDK se asocie con diferentes ciclinas, sin embargo, los resultados que aquí se presentan muestran que también una determinada ciclina puede unirse a varias CDKs.

CDK6-CCNI

Entre los nuevos complejos identificados, una de las parejas que mayor interés presenta es la formada por CDK6 y CCNI, al estar CDK6 directamente implicada en la regulación del ciclo celular y tener un papel tan prominente en cáncer. De hecho CDK6, junto con CDK4, es una diana terapéutica que presenta cada vez mayor interés (Hamilton y Infante 2016). Dicha interacción, detectada en el ensayo de Y2H, también fue confirmada mediante un experimento de *trapping* (Figura 17). Curiosamente, y a pesar de múltiples intentos, no ha sido posible demostrar la activación de CDK6 por CCNI. Esto podría ser debido a varias razones. En primer lugar, es posible que los ensayos de actividad se hayan realizado en condiciones subóptimas; nos encontramos ante un nuevo complejo del cual no conocemos sus propiedades enzimáticas, de forma que tal vez no se haya trabajado a pH, concentración de sales, etc., adecuadas. Otra posibilidad es que las proteínas utilizadas, purificadas a partir de *E. coli*, no sean activas debido a la ausencia de algún otro elemento, como fosforilaciones activadoras o modulación por asociación con proteínas 14-3-3 no presentes en este sistema de expresión. Si este fuera el caso, la purificación de los complejos expresados en células de levadura o incluso en células de mamífero que exógenamente sobreexpresen la ciclina y en que se pueda modular la cantidad de CDK6 mediante RNA de interferencia, podría ayudar a dilucidar la naturaleza de estos problemas técnicos. También es posible que aquellos sustratos que se han testado para valorar la fosforilación por parte del complejo CDK6-CCNI no sean efectivamente fosforilados por el mismo. Otra posibilidad que no podría ser descartada, es que CCNI no funcione como una ciclina activadora de CDK6 sino que, al contrario, interaccione con la misma para inhibir la actividad de otros complejos como CDK6-CCND1. Este es un fenómeno descrito para la interacción entre CDK5 y CCNE, en el cual la ciclina secuestra a CDK5 haciéndola inaccesible para su activación por parte de p35 y p39 (Odajima *et al.* 2011). Ante esta situación, sería interesante comprobar si existe disminución de la actividad del complejo CDK6-CCND1 en presencia de cantidades crecientes de CCNI.

Cabe destacar que CCNI, en el ensayo de Y2H, parece también interactuar con las PFTAIREs (CDK14 y 15) y PCTAIREs (CDK16-18), las cuales, al igual que CDK5, se expresan principalmente en tejidos post-mitóticos, especialmente cerebro. Esto podría apuntar a un papel de CCNI con especial importancia en tejido nervioso.

CDK16-SPY1

La interacción entre CDK16 y SPY1 fue reportada al tiempo que este estudio comenzaba mediante un ensayo de Y2H que buscaba interactores de CDK16 (Mikolcevic *et al.* 2012). Sin embargo, hasta el momento dicha interacción no había sido confirmada mediante otros métodos ni se había demostrado la actividad de dicho complejo. A través del trabajo que aquí se presenta se confirma la interacción de CDK16 con SPY1, tanto *in vitro* (Figura 14) como *in vivo* (Figura 15) mediante ensayos de *trapping* e IP, respectivamente. Se demuestra, además, que las dos proteínas forman un complejo activo con capacidad de autofosforilación (Figura 16).

Hasta el momento, además de la interacción con CDK16 reportada en el mencionado trabajo de Mikolcevic *et al.*, se sabía que SPY1 interacciona al menos con CDK1, 2 y 5 (Dinarina *et al.* 2005), y que los efectos de SPY1 sobre la progresión del ciclo celular son dependientes de CDKs (Cheng *et al.* 2005). La importancia de un complejo CDK16-SPY1 tal vez venga determinada por los patrones de expresión las diferentes CDKs en distintos tejidos. Ambas proteínas parecen tener funciones importantes en tejido nervioso (D Lubanska y Porter 2014; Graeser *et al.* 2002), aunque es en testículo donde presentan unos mayores niveles de expresión (Cheng, Xiong, *et al.* 2005; Besset, Rhee, y Wolgemuth 1999), de forma que el posible papel del complejo CDK16-SPY1 en meiosis u otros procesos relacionados con la formación o diferenciación de células germinales debería ser explorado.

CDK16-CCNY

La capacidad de CCNY para activar a CDK16 se conoce desde hace relativamente poco tiempo (Mikolcevic *et al.* 2012; Shehata *et al.* 2015), pero hasta el momento no ha sido descrito ningún sustrato específico del complejo. En este estudio se presenta una doble estrategia a través de la cual fue posible encontrar un sustrato de dicho complejo CDK16-CCNY.

En una primera aproximación, mediante IP acoplada a espectrometría de masas, se buscaron interactores de la ciclina. Se seleccionaron sólo aquellos que presentaban un alto grado de fiabilidad. Cabe destacar que entre los mismos, de igual modo que sucedía en los ensayos de *trapping* para CCNI, CNTD2, CCNG1 y CCNG2, no se encontró ninguna

CDK asociada a CCNY (ver Tabla 12). En cambio, sí se detectó la interacción de CCNA2 (que se incluyó como control positivo) con las CDKs 1 y 2. Este dato de nuevo apunta a las limitaciones que parece tener esta técnica para la detección de interacciones en que participan las ciclinas atípicas.

En la segunda aproximación se buscaron sustratos que son específicamente fosforilados por CDK16 gracias al uso de una forma mutada de esta quinasa, CDK16AS, que es capaz de utilizar un análogo de ATP (N^6 -2-Feniletil-ATP- γ -S) que el resto de quinasas no puede usar. De esta forma, se generó una lista de sustratos específicos de la CDK de interés. La proteína PRC1 fue detectada a través de ambas estrategias, sugiriendo que podría ser un sustrato específico del complejo CDK16-CCNY, lo cual fue confirmado mediante la realización de ensayos de fosforilación *in vitro* (Figura 21).

Necesidad de interacciones adicionales en la activación de complejos CDK-Ciclina atípicos

Ha sido descrito previamente que la actividad del complejo CDK16-CCNY, con dichas proteínas expresadas en bacterias, es independiente de CAK pero requiere de la interacción de la ciclina con una proteína 14-3-3 (Shehata *et al.* 2015). Curiosamente, y al contrario de lo que sugiere dicho estudio, en los ensayos de fosforilación *in vitro* que aquí se presentan no parece existir este requerimiento. La explicación a esto podría estar, tal vez, relacionada con las condiciones de purificación de las diferentes proteínas. Es posible que la ausencia de actividad de CDK16 purificada de bacterias no se debiera a la necesidad de otros enzimas para su activación, sino a que la quinasa es purificada mayoritariamente en forma de agregados no activos. De este modo, la reducción de la cantidad de agregados proteínicos lograda a través de la gel-filtración sería suficiente para conseguir una activación mediante CCNY.

Llamativamente, en *S. cerevisiae*, este fenómeno también se da en los complejos CDK-Ciclina formados por la CDK Pho85 y la subfamilia de ciclinas tipo PCL. En dichos complejos no es necesaria la fosforilación activadora aportada por CAK1 (*CDK Activating Kinase 1*). Esto es debido a la presencia de un aspártico en la posición 135 en las ciclinas PCL que mimetiza al residuo fosforilado por parte de CAK1 (Zheng y Quioco 2013). En el mismo estudio se observa una situación similar en la estructura cristalográfica del

Fosforilación de PRC1 por diferentes complejos CDK-Ciclina

Tanto CCNY como PRC1 están implicadas en diversos tipos de cáncer, entre ellos carcinoma hepatocelular (T. Sun, Co, y Wong 2014; Chen *et al.* 2016), donde PRC1 promueve la aparición de recidivas a través de señalización por la vía Wnt/ β -catenina. La participación de CCNY en esta importante vía de señalización hace que sea interesante investigar los efectos que PRC1 podría estar ejerciendo sobre la misma a través del complejo CDK16-CCNY, y no solo través de CDK1-CCNB1.

PRC1 posee dos sitios que son fosforilados por el complejo CDK1-CCNB1 (las treoninas en posiciones 470 y 481). Estas fosforilaciones son necesarias para que no se produzca un bloqueo mitótico y la citocinesis se produzca de forma normal (Neef *et al.* 2007). Tal y como se muestra en la Figura 21, gran parte de la fosforilación de PRC1 por parte del complejo CDK16-CCNY parece tener lugar sobre la treonina 481 (Figura 23). Será necesario investigar si el complejo es también capaz de fosforilar a la treonina 470, de forma que se pueda dilucidar en qué circunstancias cobra importancia la fosforilación de PRC1 por parte de un complejo u otro.

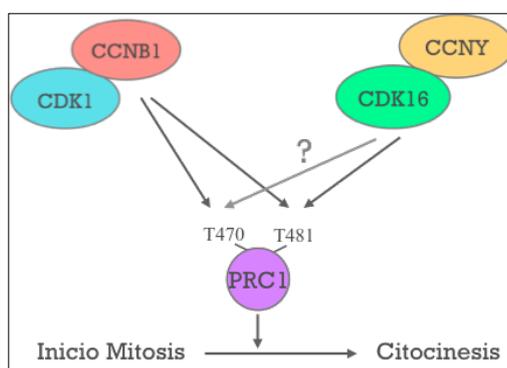


Figura 23. Fosforilación de PRC1 por diferentes complejos CDK-Ciclina.

Esto podría ser indicativo de la necesidad de una regulación muy estricta, mediada por dos mecanismos redundantes, con la finalidad de asegurar que PRC1 resulta fosforilado. También podría indicar que cada CDK sería activa en determinadas situaciones fisiológicas, ambientales o incluso en determinados tejidos. En cualquier caso, el descubrimiento de la fosforilación de este importante sustrato por parte del complejo

DISCUSIÓN

CDK16-CCNY abre una interesante línea de investigación en el campo de la regulación celular.

La idea de que cada complejo CDK-Ciclina tiene unos sustratos diferentes a los del resto de complejos y que, por tanto, ejerce una función diferencial, tal vez no sea correcta del todo (tal y como sugiere el hecho de que PRC1 sea fosforilada por dos complejos diferentes). En base al importante aumento en el número de ciclinas y CDKs a lo largo de la evolución, es posible que sea más acertado pensar en un escenario en el que los diferentes complejos CDK-Ciclina adquieran mayor importancia que otros en función de condiciones específicas, por ejemplo, en diferentes tejidos o momentos del desarrollo. De esta forma, la aparente redundancia que parece existir entre CDKs y ciclinas constituiría en realidad un refinamiento en el control del ciclo celular y otros procesos celulares como la migración, con consecuencias para el desarrollo de diversas patologías, como enfermedades neurodegenerativas o cáncer. Si este enfoque resultara ser adecuado, el creciente esfuerzo por desarrollar inhibidores de CDKs como tratamiento para este tipo de dolencias debería ir acompañado también de un esfuerzo por descubrir en qué situación cada uno de los complejos CDK-Ciclina cobra mayor importancia.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Las proteínas PURA y ERC2 interaccionan con la ciclina CCNG1.
2. La proteína MED23 interacciona con la ciclina CNTD2.
3. El presente estudio ha identificado diecisiete parejas CDK-Ciclina atípicas, de las cuales diez constituyen complejos no descritos hasta la fecha.
4. CCNI y SPY1 son ciclinas promiscuas que interaccionan con las CDKs 5, 6, 14, 15, 16, 17 y 18, y 5, 16, 17 y 18, respectivamente.
5. Los complejos CDK16-CCNY y CDK16-SPY1 presentan actividad quinasa *in vitro* independiente de CAK o proteínas 14-3-3.
6. CCNY presenta conservado el residuo Asp248 lo que sugiere que el mecanismo de activación de las ciclinas tipo PCL se encuentra conservado en la evolución.
7. Mediante aproximaciones proteómicas se han determinado posibles sustratos de los complejos CDK16-CCNY.
8. PRC1 es sustrato *in vitro* del complejo CDK16-CCNY.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido(s)	EC	Extracto celular
AD	Dominio de activación	EDTA	<i>EthyleneDiamineTetraacetic Acid</i>
Ade	Adenina	EF	Electroforesis
AgT	Antígeno T grande del virus SV40	eGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
Ala	Alanina	EGFR	Receptor de factor de crecimiento epidérmico (del inglés <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
AS	Análogo Sensitivo	ER	Receptor de Estrógeno (del inglés <i>Estrogen Receptor</i>)
bp	Pares de bases (del inglés <i>Base Pairs</i>)	ERC2	<i>ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 2</i>
CAK	Quinasa activadora de CDK (del inglés <i>CDK-Activating Kinase</i>)	Expo	Exposición
CDK	Quinasa dependiente de ciclina (del inglés <i>Cyclin Dependent Kinase</i>)	FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
cDNA	DNA complementario	g	Unidades de fuerza centrífuga
CKI	Inhibidor de CDK (del inglés <i>CDK Inhibitor</i>)	GAK	Quinasa asociada a ciclina G (del inglés <i>cyclin G Associated Kinase</i>)
CN	Control negativo	GAL4	Proteína reguladora GAL4
Co-IP	Co-Inmunoprecipitación	GSH	Glutación reducido
DDD	<i>Dma Docking Domain</i>	GST	Glutación S-transferasa
DDO	<i>Doble Drop Out</i>	h.	Hora(s)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	HA	Hemaglutinina
DNA-BD	Dominio de unión al DNA	HeBS	<i>HEPES-Buffered Saline</i>
DTT	Ditiotreitol	His	Histidina

ABREVIATURAS

IgG	Inmunoglobulina G	O/N	<i>Over night</i> (durante toda la noche)
IP	Inmunoprecipitación		
IPTG	Isopropyl- β -D-1-tiogalctopiranosido	p53	Antígeno tumoral celular p53
IRES	Sitio interno de unión del ribosoma (del inglés <i>Internal Ribosome Entry Site</i>)	PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
		PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polimerase Chain Reaction</i>)
Lam	Lamina C	pI	Punto isoeléctrico
Leu	Leucina	PM	Peso molecular
		PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
Mat a	<i>Mating</i> tipo a	PNBM	<i>p-NitroBenzyl Mesylate</i>
Mat α	<i>Mating</i> tipo α	pRb	Proteína del retinoblastoma
MCS	Sitio de clonación múltiple (del inglés <i>Multiple Cloning Site</i>)	PRC1	<i>Protein Regulator of Cytokinesis 1</i>
min.	Minuto(s)	Prec.	Precipitado
mRNA	RNA mensajero	PURA	<i>Purine Rich element binding protein A</i>
MS	Espectrometría de Masas (del inglés <i>Mass Spectrometry</i>)	QDO	<i>Quadruple Drop Out</i>
c-Myc	Proteína del proto-oncogen <i>MYC</i>	rpm	Revoluciones por minuto
n°	Número (de)	SB	Tampón de carga (del inglés <i>Sample Buffer</i>)
NLS	Señal de localización nuclear (del inglés <i>Nuclear Localization Signal</i>)	SDS	Dodecilsulfato sódico (del inglés <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
NT	No transfectada	Trp	Triptófano
OD	Densidad óptica, unidades (del inglés <i>Optical Density</i>)		

ABREVIATURAS

vol Volumen

WT Cepa/Forma salvaje (del inglés *Wild Type*)

WB *Western Blot*

Y2H Doble híbrido en levadura (del inglés *Yeast 2 Hybrid*)

WCE Extracto celular

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- An, Weiwei, Zhuzhen Zhang, Liyong Zeng, Ying Yang, Xueliang Zhu, and Jiarui Wu. 2015. "Cyclin Y Is Involved in the Regulation of Adipogenesis and Lipid Production." *PLoS ONE* 10 (7): 1–18. doi:10.1371/journal.pone.0132721.
- Ayhan, Ayse, Elisabetta Kuhn, Ren-Chin Wu, Hiroshi Ogawa, Asli Bahadirli-Talbott, Tsui-Lien Mao, Haruhiko Sugimura, Ie-Ming Shih, and Tian-Li Wang. 2017. "CCNE1 Copy-Number Gain and Overexpression Identify Ovarian Clear Cell Carcinoma with a Poor Prognosis." *Modern Pathology* 30 (2). Nature Publishing Group: 297–303. doi:10.1038/modpathol.2016.160.
- Barnes, Elizabeth A., Lisa A. Porter, Jean Luc Lenormand, Ryan W. Dellinger, and Daniel J. Donoghue. 2003. "Human Spy1 Promotes Survival of Mammalian Cells Following DNA Damage." *Cancer Research* 63 (13): 3701–7.
- Barr, S M, and E M Johnson. 2001. "Ras-Induced Colony Formation and Anchorage-Independent Growth Inhibited by Elevated Expression of Puralpha in NIH3T3 Cells." *Journal of Cellular Biochemistry* 81 (4): 621–38. doi:10.1002/jcb.1099 [pii].
- Bennin, David A., Aruni S. Arachchige Don, Tiffany Brake, Jennifer L. McKenzie, Heidi Rosenbaum, Linette Ortiz, Anna A. Depaoli-Roach, and Mary C. Horne. 2002. "Cyclin G2 Associates with Protein Phosphatase 2A Catalytic and Regulatory B' Subunits in Active Complexes and Induces Nuclear Aberrations and a G1/S Phase Cell Cycle Arrest." *Journal of Biological Chemistry* 277 (30): 27449–67. doi:10.1074/jbc.M111693200.
- Beset, V, K Rhee, and D J Wolgemuth. 1999. "The Cellular Distribution and Kinase Activity of the Cdk Family Member Pctaire1 in the Adult Mouse Brain and Testis Suggest Functions in Differentiation." *Cell Growth & Differentiation : The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research* 10 (3): 173–81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10099831>.
- Blethrow, J. D., J. S. Glavy, D. O. Morgan, and K. M. Shokat. 2008. "Covalent Capture of Kinase-Specific Phosphopeptides Reveals Cdk1-Cyclin B Substrates." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (5): 1442–47. doi:10.1073/pnas.0708966105.
- Brameier, Markus, Andrea Krings, and Robert M. MacCallum. 2007. "NucPred - Predicting Nuclear Localization of Proteins." *Bioinformatics* 23 (9): 1159–60. doi:10.1093/bioinformatics/btm066.
- Brinkkoetter, Paul T, Paul Olivier, Jimmy S Wu, Scott Henderson, Ronald D Krofft, Jeffrey W Pippin, David Hockenbery, James M Roberts, and Stuart J Shankland. 2009. "Cyclin I Activates Cdk5 and Regulates Expression of Bcl-2 and Bcl-XL in Postmitotic Mouse Cells." *The Journal of Clinical Investigation* 119 (10): 3089–3101. doi:10.1172/JCI37978.
- Charrasse, Sophie, Ilaria Carena, Joerg Hagmann, Kathie Woods-Cook, and Stefano Ferrari. 1999. "PCTAIRE-1: Characterization, Subcellular Distribution, and Cell Cycle-Dependent Kinase Activity." *Cell Growth & Differentiation* 10 (9): 611–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10511311>.
- Chen, Jianxiang, Muthukumar Rajasekaran, Hongping Xia, Xiaoqian Zhang, Shik Nie Kong, Karthik Sekar, Veerabrahma Pratap Seshachalam, *et al.* 2016. "The Microtubule-Associated Protein PRC1 Promotes Early Recurrence of Hepatocellular Carcinoma in Association with the Wnt/ β -Catenin Signalling Pathway." *Gut* 65 (9): 1522–34. doi:10.1136/gutjnl-2015-310625.
- Cheng, Aiyang, Shannon Gerry, Philipp Kaldis, and Mark J Solomon. 2005. "Biochemical Characterization of Cdk2-Speedy/Ringo A2." *BMC Biochemistry* 6 (1): 19. doi:10.1186/1471-2091-6-19.
- Cheng, Aiyang, Wen Xiong, James E. Ferrell, Jr., and Mark J. Solomon. 2005. "Identification and Comparative Analysis of Multiple Mammalian Speedy/Ringo Proteins." *Cell Cycle* 4 (1): 155–65. doi:10.4161/cc.4.1.1347.
- Chhabra, Divya, Sunita Sharma, Alvin T. Kho, Roger Gaedigk, Carrie A. Vyhlidal, J. Steven Leeder, Jarrett Morrow, *et al.* 2014. "Fetal Lung and Placental Methylation Is Associated with in Utero Nicotine Exposure." *Epigenetics* 9 (11): 1473–84. doi:10.4161/15592294.2014.971593.
- Coverley, D, C Pelizon, S Trewick, and R a Laskey. 2000. "Chromatin-Bound Cdc6 Persists in S

- and G2 Phases in Human Cells, While Soluble Cdc6 Is Destroyed in a Cyclin A-cdk2 Dependent Process." *Journal of Cell Science* 113 (Pt 1 (June): 1929–38.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10806104>.
- Cybulski, Marek, Bożena Jarosz, Andrzej Nowakowski, Witold Jeleniewicz, Przemysław Seroczyński, and Magdalena Mazurek-Kociubowska. 2012. "Cyclin I Correlates with VEGFR-2 and Cell Proliferation in Human Epithelial Ovarian Cancer." *Gynecologic Oncology* 127 (1): 217–22. doi:10.1016/j.ygyno.2012.06.038.
- Darbinian, N, G L Gallia, J King, L Del Valle, E M Johnson, and K Khalili. 2001. "Growth Inhibition of Glioblastoma Cells by Human Pur(alpha)." *J Cell Physiol* 189 (3): 334–40. doi:10.1002/jcp.10029.
- Davidson, Gary, Jinlong Shen, Ya-Lin Huang, Yi Su, Emil Karaulanov, Kerstin Bartscherer, Christine Hassler, Peter Stannek, Michael Boutros, and Christof Niehrs. 2009. "Cell Cycle Control of Wnt Receptor Activation." *Developmental Cell* 17 (6). Elsevier Ltd: 788–99. doi:10.1016/j.devcel.2009.11.006.
- Dinarina, Ana, Laurent H Perez, Amparo Davila, Markus Schwab, Tim Hunt, and Angel R Nebreda. 2005. "Characterization of a New Family of Cyclin-Dependent Kinase Activators." *Biochem. J* 386: 349–55. doi:10.1042/BJ20041779.
- Dinarina, Ana, Patricia G. Santamaria, and Angel R. Nebreda. 2009. "Cell Cycle Regulation of the Mammalian CDK Activator RINGO/Speedy A." *FEBS Letters* 583 (17). Federation of European Biochemical Societies: 2772–78. doi:10.1016/j.febslet.2009.07.028.
- Ding, Kun, Wenqing Li, Zhiqiang Zou, Xianzhi Zou, and Chengru Wang. 2014. "CCNB1 Is a Prognostic Biomarker for ER+ Breast Cancer." *Medical Hypotheses* 83 (3). Elsevier Ltd: 359–64. doi:10.1016/j.mehy.2014.06.013.
- Dixon-Clarke, Sarah E, Saifeldin N Shehata, Tobias Krojer, Timothy D Sharpe, Frank von Delft, Kei Sakamoto, and Alex N Bullock. 2017. "Structure and Inhibitor Specificity of the PCTAIRE-Family Kinase CDK16." *Biochemical Journal* 0: 699–713. doi:10.1042/BCJ20160941.
- Ferby, Ingvar, Amparo Palmer, Ramon Eritja, and Angel R Nebreda. 1999. "A Novel p34 cdc2 - Binding and Activating Protein That Is Necessary and Sufficient to Trigger G 2 / M Progression in Xenopus Oocytes." *Genes & Development*, 2177–89. doi:10.1101/gad.13.16.2177.
- Ferraiuolo, Rosa-maria, Janice Tubman, Indrajit Sinha, Caroline Hamm, and Ann Porter. 2017. "The Cyclin-like Protein , SPY1 , Regulates the ERα and ERK1 / 2 Pathways Promoting Tamoxifen Resistance" 8 (14): 23337–52.
- Finn, Robert D., Penelope Coghill, Ruth Y. Eberhardt, Sean R. Eddy, Jaina Mistry, Alex L. Mitchell, Simon C. Potter, *et al.* 2016. "The Pfam Protein Families Database: Towards a More Sustainable Future." *Nucleic Acids Research* 44 (D1): D279–85. doi:10.1093/nar/gkv1344.
- Franke, Andre, Tobias Balschun, Tom H Karlsen, Jürgen Hedderich, Sandra May, Tim Lu, Dörthe Schuldt, *et al.* 2008. "Replication of Signals from Recent Studies of Crohn's Disease Identifies Previously Unknown Disease Loci for Ulcerative Colitis." *Nature Genetics* 40 (6): 713–15. doi:10.1038/ng.148.
- Furuno, Nobuaki, Nicole Den Elzen, and Jonathon Pines. 1999. "Human Cyclin A Is Required for Mitosis until Mid Prophase." *Journal of Cell Biology* 147 (2): 295–306. doi:10.1083/jcb.147.2.295.
- Gallia, G L, E M Johnson, and K Khalili. 2000. "Puralpha: A Multifunctional Single-Stranded DNA- and RNA-Binding Protein." *Nucleic Acids Research* 28 (17): 3197–3205.
- Gan, L, P Liu, H Lu, S Chen, J Yang, J B McCarthy, K E Knudsen, and H Huang. 2009. "Cyclin D1 Promotes Anchorage-Independent Cell Survival by Inhibiting FOXO-Mediated Anoikis." *Cell Death and Differentiation* 16 (10): 1408–17. doi:10.1038/cdd.2009.86.
- Gasa, L., A. Sanchez-Botet, E. Quandt, S. Hernández-Ortega, J. Jiménez, M. A. Carrasco-García, S. Simonetti, *et al.* 2017. "A Systematic Analysis of Orphan Cyclins Reveals CNTD2 as a New Oncogenic Driver in Lung Cancer." *Scientific Reports* 7 (1): 10228. doi:10.1038/s41598-017-10770-8.

- Gastwirt, Randy F., Daniela A. Slavin, Christopher W. McAndrew, and Daniel J. Donoghue. 2006. "Spy1 Expression Prevents Normal Cellular Responses to DNA Damage: Inhibition of Apoptosis and Checkpoint Activation." *Journal of Biological Chemistry* 281 (46): 35425–35. doi:10.1074/jbc.M604720200.
- Golipour, Azadeh, Dorothy Myers, Tiffany Seagroves, Daniel Murphy, Gerard I. Evan, Daniel J. Donoghue, Roger A. Moorehead, and Lisa A. Porter. 2008. "The Spy1/RINGO Family Represents a Novel Mechanism Regulating Mammary Growth and Tumorigenesis." *Cancer Research* 68 (10): 3591–3600. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6453.
- Graeser, Ralph, Julian Gannon, Randy Y C Poon, Thierry Dubois, Alastair Aitken, and Tim Hunt. 2002. "Regulation of the CDK-Related Protein Kinase PCTAIRE-1 and Its Possible Role in Neurite Outgrowth in Neuro-2A Cells." *Journal of Cell Science* 115 (Pt 17): 3479–90. doi:10.1016/S0092-8674(00)80487-0.
- Guen, V. J., C. Gamble, M. Flajolet, S. Unger, A. Thollet, Y. Ferandin, A. Superti-Furga, P. A. Cohen, L. Meijer, and P. Colas. 2013. "CDK10/cyclin M Is a Protein Kinase That Controls ETS2 Degradation and Is Deficient in STAR Syndrome." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (48): 19525–30. doi:10.1073/pnas.1306814110.
- Gutierrez, Gustavo J., Andrea Vöglin, Ana Castro, Ingvar Ferby, Giorgia Salvagiotto, Ze'ev Ronai, Thierry Lorca, and Angel R. Nebreda. 2006. "Meiotic Regulation of the CDK Activator RINGO/Speedy by Ubiquitin-Proteasome-Mediated Processing and Degradation." *Nature Cell Biology* 8 (10): 1084–94. doi:10.1038/ncb1472.
- Hagmann, Henning, Yoshinori Taniguchi, Jeffrey W. Pippin, Hans-Michael Kauerz, Thomas Benzing, Stuart J. Shankland, and Paul Thomas Brinkkoetter. 2015. "Cyclin I and p35 Determine the Subcellular Distribution of Cdk5." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 308 (4): C339–47. doi:10.1152/ajpcell.00168.2014.
- Hamilton, Erika, and Jeffrey R. Infante. 2016. "Targeting CDK4/6 in Patients with Cancer." *Cancer Treatment Reviews* 45. Elsevier Ltd: 129–38. doi:10.1016/j.ctrv.2016.03.002.
- Hartwell, L., and T. Weinert. 1989. "Checkpoints: Controls That Ensure the Order of Cell Cycle Events." *Science* 246 (4930): 629–34. doi:10.1126/science.2683079.
- Hartwell, L.H., J. Culotti, J. R. Pringle, and B. J. Reid. 1971. "Genetic Control of the Cell Division Cycle in Yeast." *Experimental Cell Research* 67 (2): 389–401. doi:10.1016/0014-4827(71)90424-1.
- Hernández-Ortega, Sara, Samuel Bru, Natalia Ricco, Sara Ramírez, Núria Casals, Javier Jiménez, Marta Isasa, Bernat Crosas, and Josep Clotet. 2013. "Defective in Mitotic Arrest 1 (Dma1) Ubiquitin Ligase Controls G1 Cyclin Degradation." *The Journal of Biological Chemistry* 288 (7): 4704–14. doi:10.1074/jbc.M112.426593.
- Hertz, Nicholas T, Beatrice T Wang, Jasmine J Allen, Chao Zhang, Arvin C Dar, Alma L Burlingame, and Kevan M Shokat. 2010. "Chemical Genetic Approach for Kinase-Substrate Mapping by Covalent Capture of Thiophosphopeptides and Analysis by Mass Spectrometry." *Current Protocols in Chemical Biology* 2 (1): 15–36. doi:10.1002/9780470559277.ch090201.Chemical.
- Hirose, T, T Tamaru, N Okumura, K Nagai, and M Okada. 1997. "PCTAIRE 2, a Cdc2-Related Serine/threonine Kinase, Is Predominantly Expressed in Terminally Differentiated Neurons." *Eur J Biochem* 249 (2): 481–8.
- Hokkanen, Suvi, Heidi M. Feldmann, Haiyan Ding, Christian K E Jung, Lukasz Bojarski, Ingrid Renner Müller, Ulrich Schüller, Hans Kretzschmar, Eckhard Wolf, and Jochen Herms. 2012. "Lack of Pur-Alpha Alters Postnatal Brain Development and Causes Megalencephaly." *Human Molecular Genetics* 21 (3): 473–84. doi:10.1093/hmg/ddr476.
- Horne, Mary C., Gay Lynn Goolsby, Karen L. Donaldson, David Tran, Michael Neubauer, and Alan F. Wahl. 1996. "Cyclin G1 and Cyclin G2 Comprise a New Family of Cyclins with Contrasting Tissue-Specific and Cell Cycle-Regulated Expression." *Journal of Biological Chemistry* 271 (11): 6050–61. doi:10.1074/jbc.271.11.6050.
- Horne, Mary C, Karen L Donaldson, Gay Lynn Goolsby, David Tran, Michael Mulheisen, Johannes W Hell, Alan F Wahl, and A F J Biol Chem. 1997. "Cyclin G2 Is Up-Regulated during Growth Inhibition and B Cell Antigen Receptor-Mediated Cell Cycle Arrest*" 272

- (19): 12650–61.
- Hydbring, Per, Marcos Malumbres, and Piotr Sicinski. 2016. “Non-Canonical Functions of Cell Cycle Cyclins and Cyclin-Dependent Kinases.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17 (5). Nature Publishing Group: 280–92. doi:10.1038/nrm.2016.27.
- Iwatani, Kazunori, Tetsuhiro Fujimoto, and Takaaki Ito. 2010. “Cyclin D1 Blocks the Anti-Proliferative Function of RUNX3 by Interfering with RUNX3-p300 Interaction.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 400 (3). Elsevier Inc.: 426–31. doi:10.1016/j.bbrc.2010.08.094.
- Jensen, Michael Rugaard, Valentina M. Factor, Anna Fantozzi, Kristian Helin, Chang Goo Huh, and Snorri S. Thorgeirsson. 2003. “Reduced Hepatic Tumor Incidence in Cyclin G1-Deficient Mice.” *Hepatology* 37 (4): 862–70. doi:10.1053/jhep.2003.50137.
- Jiang, Mei, Yankun Gao, Tao Yang, Xueliang Zhu, and Jiangye Chen. 2009. “Cyclin Y, a Novel Membrane-Associated Cyclin, Interacts with PFTK1.” *FEBS Letters* 583 (13). Federation of European Biochemical Societies: 2171–78. doi:10.1016/j.febslet.2009.06.010.
- Johnson, E M, Chen PL, C P Krachmarov, S M Barr, M Kanovsky, Z-W. Ma, and W-H. Lee. 1995. “Association of Human Pura-Alpha with Retinoblastoma Protein, Rb, Regulates Binding to the Single-Stranded DNA Pura-Alpha Recognition Element” 270 (41): 24352–60.
- Kanaoka, Yoshihide, Shinya H. Kimura, Issey Okazaki, Masako Ikeda, and Hiroshi Nojima. 1997. “GAK: A Cyclin G Associated Kinase Contains a Tensin/auxilin-like Domain.” *FEBS Letters* 402 (1). Federation of European Biochemical Societies: 73–80. doi:10.1016/S0014-5793(96)01484-6.
- Karaiskou, Anthi, Laurent H. Perez, Ingvar Ferby, René Ozon, Catherine Jessus, and Angel R. Nebreda. 2001. “Differential Regulation of Cdc2 and Cdk2 by RINGO and Cyclins.” *Journal of Biological Chemistry* 276 (38): 36028–34. doi:10.1074/jbc.M104722200.
- Ke, Qing, Juling Ji, Chun Cheng, Yixin Zhang, Mudan Lu, You Wang, Li Zhang, *et al.* 2009. “Expression and Prognostic Role of Spy1 as a Novel Cell Cycle Protein in Hepatocellular Carcinoma.” *Experimental and Molecular Pathology* 87 (3). Elsevier Inc.: 167–72. doi:10.1016/j.yexmp.2009.07.011.
- Khalili, K., L. Del Valle, V. Muralidharan, W. J. Gault, N. Darbinian, J. Otte, E. Meier, *et al.* 2003. “PurA Is Essential for Postnatal Brain Development and Developmentally Coupled Cellular Proliferation As Revealed by Genetic Inactivation in the Mouse.” *Molecular and Cellular Biology* 23 (19): 6857–75. doi:10.1128/MCB.23.19.6857-6875.2003.
- Ko, J., Chan Yoon, Giovanni Piccoli, Hye Sun Chung, Karam Kim, Jae-Ran Lee, Hyun Woo Lee, Hyun Kim, Carlo Sala, and Eunjoon Kim. 2006. “Organization of the Presynaptic Active Zone by ERC2/CAST1-Dependent Clustering of the Tandem PDZ Protein Syntenin-1.” *Journal of Neuroscience* 26 (3): 963–70. doi:10.1523/JNEUROSCI.4475-05.2006.
- Ko, Jaewon, Moonseok Na, Seho Kim, Jae Ran Lee, and Eunjoon Kim. 2003. “Interaction of the ERC Family of RIM-Binding Proteins with the Liprin-?? Family of Multidomain Proteins.” *Journal of Biological Chemistry* 278 (43): 42377–85. doi:10.1074/jbc.M307561200.
- Kuhn, Elisabetta, Tian-Li Wang, Kai Doberstein, Asli Bahadırli-Talbott, Ayse Ayhan, Ann Smith Sehdev, Ronny Drapkin, Robert J Kurman, and Ie-Ming Shih. 2016. “CCNE1 Amplification and Centrosome Number Abnormality in Serous Tubal Intraepithelial Carcinoma: Further Evidence Supporting Its Role as a Precursor of Ovarian High-Grade Serous Carcinoma.” *Modern Pathology* 29 (10). Nature Publishing Group: 1254–61. doi:10.1038/modpathol.2016.101.
- Landberg, Göran, Kristina Nilsson, Karin Jirström, Lisa Rydén, Richard Kitching, Angelika M. Burger, and Arun Seth. 2005. “Cyclin I Is Expressed in Human Breast Cancer and Closely Associated with VEGF and KDR Expression.” *Breast Cancer Research and Treatment* 89 (3): 313–16. doi:10.1007/s10549-004-2230-y.
- Le, Bouffant F, J Capdevielle, J C Guillemot, and F Sladeczek. 1998. “Characterization of Brain PCTAIRE-1 Kinase Immunoreactivity and Its Interactions with p11 and 14-3-3 Proteins.” *Eur.J.Biochem.* 257 (0014–2956 (Print)): 112–20. doi:10.1046/j.1432-1327.1998.2570112.x.
- Lenormand, J.-L. 1999. “Speedy: A Novel Cell Cycle Regulator of the G2/M Transition.” *The*

- EMBO Journal* 18 (7): 1869–77. doi:10.1093/emboj/18.7.1869.
- Levin, Rebecca S., Nicholas T. Hertz, Alma L. Burlingame, Kevan M. Shokat, and Shaeri Mukherjee. 2016. “Innate Immunity Kinase TAK1 Phosphorylates Rab1 on a Hotspot for Posttranslational Modifications by Host and Pathogen.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201608355. doi:10.1073/pnas.1608355113.
- Li, R., G. Z. Liu, S. Y. Luo, R. Chen, and J. X. Zhang. 2015. “Cyclin I Promotes Cisplatin Resistance via Cdk5 Activation in Cervical Cancer.” *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 19 (23): 4533–41.
- Li, Xuanyang, Xiang Wang, Guoyuan Liu, Rui Li, and Long Yu. 2009. “Identification and Characterization of Cyclin X Which Activates Transcriptional Activities of c-Myc.” *Molecular Biology Reports* 36: 97–103. doi:10.1007/s11033-007-9156-5.
- Lim, Shuhui, and Philipp Kaldis. 2013. “Cdks, Cyclins and CKIs: Roles beyond Cell Cycle Regulation.” *Development* 140 (15): 3079–93. doi:10.1242/dev.091744.
- Liu, Dongmei, and Russell L. Finley. 2010. “Cyclin Y Is a Novel Conserved Cyclin Essential for Development in *Drosophila*.” *Genetics* 184 (4): 1025–35. doi:10.1534/genetics.110.114017.
- Liu, Fang, Xiaoping Gao, Haili Yu, Dongzhi Yuan, Jinhu Zhang, Yaping He, and Limin Yue. 2013. “Effects of Expression of Exogenous Cyclin G1 on Proliferation of Human Endometrial Carcinoma Cells.” *The Chinese Journal of Physiology* 56 (2): 83–89. doi:10.4077/CJP.2013.BAA079.
- Liu, Haiyuan, Honghui Shi, Qingbo Fan, and Xiangxiu Sun. 2016. “Cyclin Y Regulates the Proliferation, Migration, and Invasion of Ovarian Cancer Cells via Wnt Signaling Pathway.” *Tumor Biology* 37 (8): 10161–75. doi:10.1007/s13277-016-4818-3.
- Liu, Hong, Sharon M. Barr, Caryn Chu, D. Stave Kohtz, Yayoi Kinoshita, and Edward M. Johnson. 2005. “Functional Interaction of PurA with the Cdk2 Moiety of Cyclin A/Cdk2.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 328 (4): 851–57. doi:10.1016/j.bbrc.2005.01.038.
- Liu, J., and E. T. Kipreos. 2000. “Evolution of Cyclin-Dependent Kinases (CDKs) and CDK-Activating Kinases (CAKs): Differential Conservation of CAKs in Yeast and Metazoa.” *Molecular Biology and Evolution* 17 (7): 1061–74. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026387.
- Lu, Xiaoyan, Jia Liu, and Randy J Legerski. 2009. “Cyclin E Is Stabilized in Response to Replication Fork Barriers Leading to Prolonged S Phase Arrest * □” 284 (51): 35325–37. doi:10.1074/jbc.M109.035949.
- Lubanska, D, and L A Porter. 2014. “The Atypical Cell Cycle Regulator Spy1 Suppresses Differentiation of the Neuroblastoma Stem Cell Population.” *Oncoscience* 1 (5): 336–48. doi:10.18632/oncoscience.36.
- Lubanska, Dorota, BrennaA Market-Velker, AnaC deCarvalho, Tom Mikkelsen, Elizabeth FidalgoSilva, and LisaA Porter. 2014. “The Cyclin-like Protein spy1 Regulates Growth and Division Characteristics of the CD133+ Population in Human Glioma.” *Cancer Cell* 25 (1). Elsevier Inc.: 64–76. doi:10.1016/j.ccr.2013.12.006.
- Lundberg, A S, and R A Weinberg. 1998. “Functional Inactivation of the Retinoblastoma Protein Requires Sequential Modification by at Least Two Distinct Cyclin-Cdk Complexes.” *Molecular and Cellular Biology* 18 (2): 753–61. doi:10.1128/MCB.18.2.753.
- Malik, Sohail, and Robert G. Roeder. 2010. “The Metazoan Mediator Co-Activator Complex as an Integrative Hub for Transcriptional Regulation.” *Nature Reviews Genetics* 11 (11): 761–72. doi:10.1038/nrg2901.
- Malumbres, M. 2014. “Cyclin-Dependent Kinases.” *Genome Biology* 15 (6): 122. doi:10.1186/gb4184.
- Malumbres, M, and M Barbacid. 2001. “To Cycle or Not to Cycle: A Critical Decision in Cancer.” *Nature Reviews. Cancer* 1 (December): 222–31. doi:10.1038/35106065.
- Malumbres, Marcos, and Mariano Barbacid. 2005. “Mammalian Cyclin-Dependent Kinases.” *Trends in Biochemical Sciences* 30 (11): 630–41. doi:10.1016/j.tibs.2005.09.005.
- Manning, G. 2002. “The Protein Kinase Complement of the Human Genome.” *Science* 298

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (5600): 1912–34. doi:10.1126/science.1075762.
- McAndrew, Christopher W., Randy F. Gastwirt, April N. Meyer, Lisa A. Porter, and Daniel J. Donoghue. 2007. “Spy1 Enhances Phosphorylation and Degradation of the Cell Cycle Inhibitor p27.” *Cell Cycle* 6 (15): 1937–45. doi:10.4161/cc.6.15.4520.
- Mikolcevic, Petra, Michitaka Isoda, Hiroki Shibuya, Ivan del Barco Barrantes, Ana Igea, José A. Suja, Sue Shackleton, Yoshinori Watanabe, and Angel R. Nebreda. 2016. “Essential Role of the Cdk2 Activator RingoA in Meiotic Telomere Tethering to the Nuclear Envelope.” *Nature Communications* 7: 11084. doi:10.1038/ncomms11084.
- Mikolcevic, Petra, Reinhard Sigl, Veronika Rauch, Michael W. Hess, Kristian Pfaller, Marin Barisic, Lauri J. Pelliniemi, Michael Boesl, and Stephan Geley. 2012. “Cyclin-Dependent Kinase 16/PCTAIRE Kinase 1 Is Activated by Cyclin Y and Is Essential for Spermatogenesis.” *Molecular and Cellular Biology* 32 (4): 868–79. doi:10.1128/MCB.06261-11.
- Moffat, Jason, and Brenda Andrews. 2004. “Late-G1 cyclin-CDK Activity Is Essential for Control of Cell Morphogenesis in Budding Yeast.” *Nature Cell Biology* 6 (1): 59–66. doi:10.1038/ncb1078.
- Morgan, David O. 1997. “CYCLIN-DEPENDENT KINASES: Engines, Clocks, and Microprocessors.” *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 13 (1): 261–91. doi:10.1146/annurev.cellbio.13.1.261.
- Murray, Andrew W, and Debora Marks. 2001. “Can Sequencing Shed Light on Cell Cycling?” 409 (February): 844–46.
- Nagano, Taiki, Toshiaki Hashimoto, Akio Nakashima, Shin-ichi Hisanaga, Taiki Nagano, Toshiaki Hashimoto, Akio Nakashima, Shin-ichi Hisanaga, Ushio Kikkawa, and Shinji Kamada. 2013. “Cyclin I Is Involved in the Regulation of Cell Cycle Progression.” *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 12 (16): 2617–24. doi:10.4161/cc.25623.
- Nakamura, T, R Sanokawa, Y F Sasaki, D Ayusawa, M Oishi, and N Mori. 1995. “Cyclin I: A New Cyclin Encoded by a Gene Isolated from Human Brain.” *Experimental Cell Research* 221 (2): 534–42. doi:10.1006/excr.1995.1406.
- Nebreda, Angel R. 2006. “CDK Activation by Non-Cyclin Proteins.” *Current Opinion in Cell Biology* 18 (2): 192–98. doi:10.1016/j.ceb.2006.01.001.
- Neef, Rüdiger, Ulrike Gruneberg, Robert Kopajtich, Xiuling Li, Erich A. Nigg, Herman Sillje, and Francis A. Barr. 2007. “Choice of Plk1 Docking Partners during Mitosis and Cytokinesis Is Controlled by the Activation State of Cdk1.” *Nature Cell Biology* 9 (4): 436–44. doi:10.1038/ncb1557.
- Noble, Martin E M, Jane A. Endicott, Nick R. Brown, and Louise N. Johnson. 1997. “The Cyclin Box Fold: Protein Recognition in Cell-Cycle and Transcription Control.” *Trends in Biochemical Sciences* 22 (12): 482–87. doi:10.1016/S0968-0004(97)01144-4.
- Nurse, P, and Y Bissett. 1981. “Gene Required in G1 for Commitment to Cell Cycle and in G2 for Control of Mitosis in Fission Yeast.” *Nature*. doi:10.1038/292558a0.
- Odajima, Junko, Zachary P. Wills, Yasmine M. Ndassa, Miho Terunuma, Karla Kretschmannova, Tarek Z. Deeb, Yan Geng, *et al.* 2011. “Cyclin E Constrains Cdk5 Activity to Regulate Synaptic Plasticity and Memory Formation.” *Developmental Cell* 21 (4): 655–68. doi:10.1016/j.devcel.2011.08.009.
- Ohtsuka, Takao, Hoon Ryu, Yohji A Minamishima, Akihide Ryo, and Sam W Lee. 2003. “Modulation of p53 and p73 Levels by Cyclin G: Implication of a Negative Feedback Regulation.” *Oncogene* 22 (11): 1678–87. doi:10.1038/sj.onc.1206306.
- Okamoto, Koji, Hongyun Li, Michael R. Jensen, Tingting Zhang, Yoichi Taya, Snorri S. Thorgeirsson, and Carol Prives. 2002. “Cyclin G Recruits PP2A to Dephosphorylate Mdm2.” *Molecular Cell* 9 (4): 761–71. doi:10.1016/S1097-2765(02)00504-X.
- Ota, Toshio, Yutaka Suzuki, Tetsuo Nishikawa, Tetsuji Otsuki, Tomoyasu Sugiyama, Ryotaro Irie, Ai Wakamatsu, *et al.* 2004. “Complete Sequencing and Characterization of 21,243 Full-Length Human cDNAs.” *Nature Genetics* 36 (1): 40–45. doi:10.1038/ng1285.
- Ou, Chan-yen, Vivian Y Poon, Celine I Maeder, Shigeki Watanabe, Emily K. Lehrman, Amy K.Y. Fu, Mikyoung Park, *et al.* 2010. “Two Cyclin-Dependent Kinase Pathways Are Essential

- for Polarized Trafficking of Presynaptic Components." *Cell* 141 (5): 846–58. doi:10.1016/j.cell.2010.04.011.
- Pardee, A. B. 1974. "A Restriction Point for Control of Normal Animal Cell Proliferation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 71 (4): 1286–90. doi:10.1073/pnas.71.4.1286.
- Park, Mikiyoung, Shigeki Watanabe, Vivian Yi Nuo Poon, Chan Yen Ou, Erik M. Jorgensen, and Kang Shen. 2011. "CYY-1/Cyclin Y and CDK-5 Differentially Regulate Synapse Elimination and Formation for Rewiring Neural Circuits." *Neuron* 70 (4). Elsevier Inc.: 742–57. doi:10.1016/j.neuron.2011.04.002.
- Petersen, Birgit Otzen, Jiri Lukas, Claus Storgaard Sørensen, Jiri Bartek, and Kristian Helin. 1999. "Phosphorylation of Mammalian CDC6 by Cyclin A/CDK2 Regulates Its Subcellular Localization." *EMBO Journal* 18 (2): 396–410. doi:10.1093/emboj/18.2.396.
- Peterson, Luke F, Anita Boyapati, Velvizhi Ranganathan, Atsushi Iwama, Daniel G Tenen, Schickwann Tsai, and Dong-Er Zhang. 2005. "The Hematopoietic Transcription Factor AML1 (RUNX1) Is Negatively Regulated by the Cell Cycle Protein Cyclin D3." *Molecular and Cellular Biology* 25 (23): 10205–19. doi:10.1128/MCB.25.23.10205-10219.2005.
- Piscopo, Denise M, and Philip W Hinds. 2008. "A Role for the Cyclin Box in the Ubiquitin-Mediated Degradation of Cyclin G1." *Cancer Research* 68 (14): 5581–90. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6346.
- Porter, Lisa A., Ryan W. Dellinger, John A. Tynan, Elizabeth A. Barnes, Monica Kong, Jean Luc Lenormand, and Daniel J. Donoghue. 2002. "Human Speedy: A Novel Cell Cycle Regulator That Enhances Proliferation through Activation of Cdk2." *Journal of Cell Biology* 157 (3): 357–66. doi:10.1083/jcb.200109045.
- Porter, Lisa A, Monica Kong-Beltran, and Daniel J. Donoghue. 2003. "Spy1 Interacts with p27Kip1 to Allow G1/S Progression." *Molecular Biology of the Cell* 14 (May): 2559–69. doi:10.1091/mbc.E02.
- Ropers, Hans Hilger. 2010. "Genetics of Early Onset Cognitive Impairment." *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 11 (1): 161–87. doi:10.1146/annurev-genom-082509-141640.
- Russell, P, B T Hennessy, J Li, M S Carey, R C Bast, T Freeman, and a R Venkitaraman. 2012. "Cyclin G1 Regulates the Outcome of Taxane-Induced Mitotic Checkpoint Arrest." *Oncogene* 31 (19): 2450–60. doi:10.1038/onc.2011.431.
- Saito, Taro, Tsunetada Konno, Tomohisa Hosokawa, Akiko Asada, Koichi Ishiguro, and Shin Ichi Hisanaga. 2007. "p25/Cyclin-Dependent Kinase 5 Promotes the Progression of Cell Death in Nucleus of Endoplasmic Reticulum-Stressed Neurons." *Journal of Neurochemistry* 102 (1): 133–40. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04540.x.
- Santamaría, David, Cédric Barrière, Antonio Cerqueira, Sarah Hunt, Claudine Tardy, Kathryn Newton, Javier F Cáceres, Pierre Dubus, Marcos Malumbres, and Mariano Barbacid. 2007. "Cdk1 Is Sufficient to Drive the Mammalian Cell Cycle." *Nature* 448 (August): 811–15. doi:10.1038/nature06046.
- Satyanarayana, A, and P Kaldis. 2009. "Mammalian Cell-Cycle Regulation: Several Cdks, Numerous Cyclins and Diverse Compensatory Mechanisms." *Oncogene* 28 (33). Nature Publishing Group: 2925–39. doi:10.1038/onc.2009.170.
- Seo, H R, D H Lee, H J Lee, M Baek, S Bae, J W Soh, S J Lee, J Kim, and Y S Lee. 2006. "Cyclin G1 Overcomes Radiation-Induced G2 Arrest and Increases Cell Death through Transcriptional Activation of Cyclin B1." *Cell Death and Differentiation* 13 (9): 1475–84. doi:10.1038/sj.cdd.4401822.
- Shehata, Saifeldin N., Maria Deak, Nicholas A. Morrice, Eriko Ohta, Roger W. Hunter, Vera M. Kalscheuer, and Kei Sakamoto. 2015. "Cyclin Y Phosphorylation- and 14-3-3-Binding-Dependent Activation of PCTAIRE-1/CDK16." *Biochemical Journal* 469 (3): 409–20. doi:10.1042/BJ20150486.
- Sherr, Charles J, and James M Roberts. 2004. "Living with or without Cyclins and Cyclin-Dependent Kinases." *Genes & Development* 18 (22): 2699–2711. doi:10.1101/gad.1256504.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Shi, Jianxin, Qingqi Han, Heng Zhao, Chenxi Zhong, and Feng Yao. 2014. "Downregulation of MED23 Promoted the Tumorigenicity of Esophageal Squamous Cell Carcinoma." *Molecular Carcinogenesis* 53 (10): 833–40. doi:10.1002/mc.22041.
- Shi, Jianxin, Hongcheng Liu, Feng Yao, Chenxi Zhong, and Heng Zhao. 2014. "Upregulation of Mediator MED23 in Non-Small-Cell Lung Cancer Promotes the Growth, Migration, and Metastasis of Cancer Cells." *Tumor Biology* 35 (12): 12005–13. doi:10.1007/s13277-014-2499-3.
- Smith, Martin L., H.Udo Kontny, Rachel Bortnick, and Albert J. Fornace. 1997. "The p53-Regulated Cyclin G Gene Promotes Cell Growth: p53 Downstream Effectors Cyclin G and Gadd45 Exert Different Effects on Cisplatin Chemosensitivity." *Experimental Cell Research* 230 (1): 61–68. doi:10.1006/excr.1996.3402.
- So, Jonathan, Adrian Pasculescu, Anna Y Dai, Kelly Williton, Andrew James, Vivian Nguyen, Pau Creixell, *et al.* 2015. "Integrative Analysis of Kinase Networks in TRAIL-Induced Apoptosis Provides a Source of Potential Targets for Combination Therapy." *Sci. Signal* 8 (371): 13–15. doi:10.1126/scisignal.2005700.
- Solomon, M. J., T. Lee, and M. W. Kirschner. 1992. "Role of Phosphorylation in p34cdc2 Activation: Identification of an Activating Kinase." *Molecular Biology of the Cell* 3 (1): 13–27. doi:10.1091/mbc.3.1.13.
- Stacey, D W, M Hitomi, M Kanovsky, L Gan, and E M Johnson. 1999. "Cell Cycle Arrest and Morphological Alterations Following Microinjection of NIH3T3 Cells with Pur Alpha." *Oncogene* 18 (29): 4254–61. doi:10.1038/sj.onc.1202795.
- Sterlacci, William, Michael Fiegl, Wolfgang Hilbe, Herbert Jamnig, Wilhelm Oberaigner, Thomas Schmid, Florian Augustin, Jutta Auberger, Ellen C Obermann, and Alexandar Tzankov. 2010. "Deregulation of p27 and Cyclin D1/D3 Control over Mitosis Is Associated with Unfavorable Prognosis in Non-Small Cell Lung Cancer, as Determined in 405 Operated Patients." *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 5 (9). International Association for the Study of Lung Cancer: 1325–36. doi:10.1097/JTO.0b013e3181e77efc.
- Subramanian, Radhika, Elizabeth M. Wilson-Kubalek, Christopher P. Arthur, Matthew J. Bick, Elizabeth A. Campbell, Seth A. Darst, Ronald A. Milligan, and Tarun M. Kapoor. 2010. "Insights into Antiparallel Microtubule Crosslinking by PRC1, a Conserved Nonmotor Microtubule Binding Protein." *Cell* 142 (3). Elsevier Ltd: 433–43. doi:10.1016/j.cell.2010.07.012.
- Sun, G G, W N Hu, D W Cui, and J Zhang. 2014. "Decreased Expression of CCNG2 Is Significantly Linked to the Malignant Transformation of Gastric Carcinoma." *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35 (3): 2631–39. doi:10.1007/s13277-013-1346-2.
- Sun, Tingting, Ngai Na Co, and Nathalie Wong. 2014. "PFTK1 Interacts with Cyclin Y to Activate Non-Canonical Wnt Signaling in Hepatocellular Carcinoma." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 449 (1). Elsevier Inc.: 163–68. doi:10.1016/j.bbrc.2014.05.002.
- Taatjes, Dylan J. 2010. "The Human Mediator Complex: A Versatile, Genome-Wide Regulator of Transcription." *Trends in Biochemical Sciences* 35 (6): 315–22. doi:10.1016/j.tibs.2010.02.004.
- Tsai, Li-Huei, Takao Takahashi, Verne S Jr. Caviness, and Ed Harlow. 1993. "Activity and Expression Pattern of Cyclin-Dependant Kinase 5 in the Embryonic Mouse Nervous System." *Development* 119: 1029–40.
- Voets, Erik, Judith Marsman, Jeroen Demmers, Roderick Beijersbergen, and Rob Wolthuis. 2015. "The Lethal Response to Cdk1 Inhibition Depends on Sister Chromatid Alignment Errors Generated by KIF4 and Isoform 1 of PRC1." *Scientific Reports* 5 (October). Nature Publishing Group: 14798. doi:10.1038/srep14798.
- Wallmeier, Julia, Dalal Al-Mutairi, Chun-Ting Chen, Niki Tomas Loges, Petra Pennekamp, Tabea Menchen, Lina Ma, *et al.* 2014. "Mutations in CCNO Result in Congenital Mucociliary Clearance Disorder with Reduced Generation of Multiple Motile Cilia."

- Nature Genetics* 46 (6): 646–51. doi:10.1038/ng.2961.
- Weishaupt, J H, C Neusch, and M Bähr. 2003. “Cyclin-Dependent Kinase 5 (CDK5) and Neuronal Cell Death.” *Cell and Tissue Research* 312 (1): 1–8. doi:10.1007/s00441-003-0703-7.
- Wen, Wen, Jin Ding, Wen Sun, Jing Fu, Yao Chen, Kun Wu, Beifang Ning, *et al.* 2012. “Cyclin G1-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition via Phosphoinositide 3-kinase/Akt Signaling Facilitates Liver Cancer Progression.” *Hepatology* 55 (6): 1787–98. doi:10.1002/hep.25596.
- Wen, Wen, Tao Han, Cheng Chen, Lei Huang, Wen Sun, Xue Wang, Shu-Zhen Chen, *et al.* 2013. “Cyclin G1 Expands Liver Tumor-Initiating Cells by Sox2 Induction via Akt/mTOR Signaling.” *Molecular Cancer Therapeutics* 12 (9): 1796–1804. doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0099.
- Xiao, Xiyan, Liang Zhou, Pengyu Cao, Hongli Gong, and Yanping Zhang. 2015. “MicroRNA-93 Regulates Cyclin G2 Expression and Plays an Oncogenic Role in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma.” *International Journal of Oncology* 46 (1): 161–74. doi:10.3892/ijo.2014.2704.
- Xu, Shuangbing, Xu Li, Zihua Gong, Wenqi Wang, Yujing Li, Binoj Chandrasekharan Nair, Hailong Piao, Kunyu Yang, Gang Wu, and Junjie Chen. 2014. “Proteomic Analysis of the Human Cyclin-Dependent Kinase Family Reveals a Novel CDK5 Complex Involved in Cell Growth and Migration.” *Molecular & Cellular Proteomics* 13 (11): 2986–3000. doi:10.1074/mcp.M113.036699.
- Xu, YongGang, Zhi Wang, Jie Wang, JianHua Li, HongWei Wang, and Wu Yue. 2009. “Lentivirus-Mediated Knockdown of Cyclin Y (CCNY) Inhibits Glioma Cell Proliferation.” *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics* 18 (8): 359–64. doi:10.3727/096504010X12644422320582.
- Yan, Feng, Xiaoming Wang, Mingchen Zhu, and Xiaoya Hu. 2016. “RNAi-Mediated Downregulation of Cyclin-Y to Attenuate Human Breast Cancer Cell Growth.” *Oncology Reports*, 2793–99. doi:10.3892/or.2016.5126.
- Yanagi, Teruki, Maryla Krajewska, Shu Ichi Matsuzawa, and John C. Reed. 2014. “PCTAIRE1 Phosphorylates p27 and Regulates Mitosis in Cancer Cells.” *Cancer Research* 74 (20): 5795–5807. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0872.
- Yanagi, Teruki, and Shu Ichi Matsuzawa. 2015. “PCTAIRE1/PCTK1/CDK16: A New Oncotarget?” *Cell Cycle* 14 (4): 463–64. doi:10.1080/15384101.2015.1006539.
- Yanagi, Teruki, Kiyoshi Tachikawa, Rachel Wilkie-Grantham, Asami Hishiki, Ko Nagai, Ellen Toyonaga, Pad Chivukula, and Shu-ichi Matsuzawa. 2016. “Lipid Nanoparticle-Mediated siRNA Transfer Against PCTAIRE1/PCTK1/Cdk16 Inhibits In Vivo Cancer Growth.” *Molecular Therapy—Nucleic Acids* 5 (6). IOP Publishing: e327. doi:10.1038/mtna.2016.40.
- Yang, Jun, Yingxin Zhao, Mridul Kalita, Xueling Li, Mohammad Jamaluddin, Bing Tian, Chukwudi B Edeh, John E Wiktorowicz, Andrzej Kudlicki, and Allan R Brasier. 2015. “Systematic Determination of Human Cyclin Dependent Kinase (CDK)-9 Interactome Identifies Novel Functions in RNA Splicing Mediated by the DEAD Box (DDX)-5/17 RNA Helicases.” *Molecular & Cellular Proteomics* 14 (10): 2701–21. doi:10.1074/mcp.M115.049221.
- Yang, X., M. Zhao, M. Xia, Y. Liu, J. Yan, H. Ji, and G. Wang. 2012. “PNAS Plus: Selective Requirement for Mediator MED23 in Ras-Active Lung Cancer.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (41): E2813–22. doi:10.1073/pnas.1204311109.
- Yue, Wentao, Xiaoting Zhao, Lina Zhang, Shaofa Xu, Zhidong Liu, Li Ma, Wenyun Jia, *et al.* 2011. “Cell Cycle Protein Cyclin Y Is Associated with Human Non-Small-Cell Lung Cancer Proliferation and Tumorigenesis.” *Clinical Lung Cancer* 12 (1): 43–50. doi:10.3816/CLC.2011.n.006.
- Zeng, Liyong, Chegao Cai, Shan Li, Wenjuan Wang, Yaping Li, Jiangye Chen, Xueliang Zhu, and Yi Ariel Zeng. 2016. “Essential Roles of Cyclin Y-Like 1 and Cyclin Y in Dividing Wnt-Responsive Mammary Stem/Progenitor Cells.” *PLoS Genetics* 12 (5): 1–21.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- doi:10.1371/journal.pgen.1006055.
- Zhang, Lei, Ole Gjoerup, and Thomas M Roberts. 2004. "The Serine/threonine Kinase Cyclin G-Associated Kinase Regulates Epidermal Growth Factor Receptor Signaling." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (28): 10296–301. doi:10.1073/pnas.0403175101.
- Zheng, Fei, and Florante A. Quioco. 2013. "New Structural Insights into Phosphorylation-Free Mechanism for Full Cyclin-Dependent Kinase (CDK)-Cyclin Activity and Substrate Recognition." *Journal of Biological Chemistry* 288 (42): 30682–92. doi:10.1074/jbc.M113.502773.
- Zi, Zhenzhen, Zhuzhen Zhang, Qingrun Li, Weiwei An, Liyong Zeng, Dayuan Gao, Ying Yang, *et al.* 2015. "CCNYL1, but Not CCNY, Cooperates with CDK16 to Regulate Spermatogenesis in Mouse." *PLoS Genetics* 11 (8): 1–22. doi:10.1371/journal.pgen.1005485.
- Zucchi, I., E. Mento, V. A. Kuznetsov, M. Scotti, V. Valsecchi, B. Simionati, E. Vicinanza, *et al.* 2004. "Gene Expression Profiles of Epithelial Cells Microscopically Isolated from a Breast-Invasive Ductal Carcinoma and a Nodal Metastasis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (52): 18147–52. doi:10.1073/pnas.0408260101.
- Zukerberg, L R, G N Patrick, M Nikolic, S Humbert, C L Wu, L M Lanier, F B Gertler, M Vidal, R a Van Etten, and L H Tsai. 2000. "Cables Links Cdk5 and c-Abl and Facilitates Cdk5 Tyrosine Phosphorylation, Kinase Upregulation, and Neurite Outgrowth." *Neuron* 26 (3): 633–46. doi:10.1016/S0896-6273(00)81200-3.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXOS

ANEXO I: Isoformas de las ciclinas atípicas

La Tabla 15 presenta las diferentes isoformas de las ciclinas atípicas que se recogen en las bases de datos NCBI y UniProt. Tal y como se puede observar, para algunas de las ciclinas existen discrepancias en cuanto al número de isoformas validadas según cada una de las bases de datos. También se aprecia que la isoforma considerada canónica (la número 1 en la Tabla 4) difiere en algunos casos según la base de datos.

Tabla 15. Isoformas de las ciclinas atípicas (continúa en la siguiente página). Se muestran las diferentes isoformas de las ciclinas atípicas, según UniProt y NCBI, así como sus longitudes en número de pares de bases y aminoácidos, sus pesos moleculares (PM) y sus puntos isoeléctricos (pI). También se señala si cada una de las bases de datos ha validado la existencia de dichas isoformas.

CICLINA	ISOFORMA		n° aa	PM (KDa)	pI	Validación	
	Uniprot	NCBI				Uniprot	NCBI
CABLES1	1	—	568	61.4	9.35	✓	✗
	—	1	368	41.9	9.62	✗	✓
	—	2	633	67.6	9.32	✗	✓
	—	3	306	34.6	9.32	✗	✓
CCNG1	1	1, 2	295	34	9.06	✓	✓
	2	—	161	18.8	9.47	✗	✗
CCNG2	1	1	344	38.8	5.33	✓	✓
	2	—	304	34.5	6.09	✗	✗
CCNI	1	1	377	42.56	8.23	✓	✓
	2	-	363	40.87	5.97	✗	✗
	-	c-h				✗	✓
CCNJ	1	2	372	42.3	6.75	✓	✓
	2	3	371	42.5	6.75	✓	✓
	3	1	383	43.8	6.59	✓	✓
CCNJL	1	1	435	48.4	7.28	✓	✓
	2	—	166	19	9.79	✓	✗
	—	2	387	43.6	6.99	✗	✓
CCNO	1	1	350	38.1	8.44	✓	✓
	2	—	131	14.3	9.86	✓	✗

ANEXOS

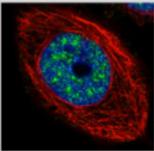
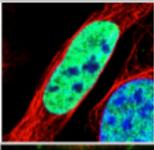
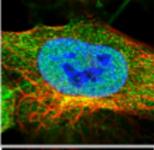
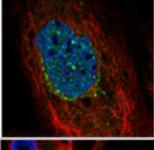
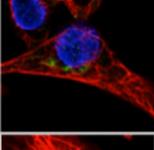
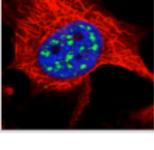
CICLINA	ISOFORMA		n° aa	PM (KDa)	pI	Validación	
	Uniprot	NCBI				Uniprot	NCBI
CCNY	1	1	341	39.3	6.76	✓	✓
	2	3	316	36.5	7.57	✓	✓
	3	2	287	33.2	7.62	✓	✓
	—	5	208	24.1	5.33	✗	✓
CCNYL	1	3	359	40.7	5.7	✓	✓
	2	1	308	34.9	5.34	✓	✓
	3	2	289	33.4	6.46	✓	✓
CNPPD1	1	1	410	45.4	5.47	✓	✓
CNTD1	1	1	330	36.9	6.46	✓	✓
	2	—	128	13.8	6.27	✗	✗
	—	2	247	27.4	8.59	✗	✓
CNTD2	1	1	307	33.6	8.96	✓	✓
	2	—	155	16.7	5.43	✓	✗
FAM58A	1	1	248	28.4	5.84	✓	✓
	2	2	228	26.1	6.3	✗	✓
SPY1	2	1	313	36.4	9.07	✓	✓
	1	2	286	33.3	9.05	✓	✓

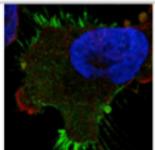
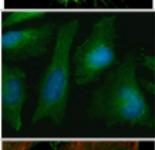
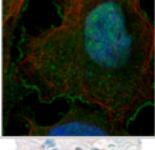
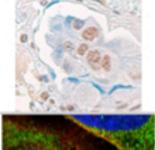
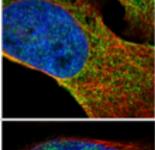
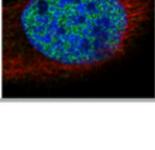
Fuentes: UniProt, NCBI. Los símbolos “✓” y “✗” indican que la isoforma ha sido validada o no, respectivamente, por cada una de las bases de datos.

ANEXO II: Localización subcelular de las ciclinas atípicas

En la Tabla 16 se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia obtenidas de la base de datos *Human Protein Atlas* (HPA, www.proteinatlas.org), que selecciona diferentes líneas celulares para su tinción en base a datos de expresión de mRNA.

Tabla 16. Localización subcelular de las ciclinas atípicas.

CICLINA	LOCALIZACIÓN SUBCELULAR	IMAGEN
CABLES1	Núcleo (granular)	
CCNG1	Nucleoplasma	
CCNG2	Citosol, nucleoplasma	
CCNI	Golgi, nucleoplasma, cuerpos nucleares	
CCNJ	Golgi, nucleoplasma	
CCNJL	Núcleo (granular)	
CCNO	NA	NA

CICLINA	LOCALIZACIÓN SUBCELULAR	IMAGEN
CCNY ¹	Núcleo, membrana plasmática	NA
CCNYL	Membrana plasmática	
CNPPD1 ²	Reticulo endoplásmico	
CNTD1	Citosol, núcleo, membrana plasmática	
CNTD2 ³	Núcleo	
FAM58A	Citosol, nucleoplasma	
SPY1	Nucleoplasma	

Fuente: Human Protein Atlas (www.proteinatlas.org). Las imágenes de microscopía de fluorescencia muestran las ciclinas de interés en verde, los núcleos en azul y los microtúbulos en rojo. ¹Según UniProt. ²Según casa comercial GeneTex (GTX102015). ³Datos propios de inmunohistoquímica (Gasa *et al.* 2017).

ANEXOS

Aunque no se dispone de información en HPA para CNPPD1, se incluyó la imagen que proporciona la casa comercial GeneTex en la información de uno de sus anticuerpos. Así mismo, se incluyó una imagen de una inmunohistoquímica de CNTD2 que ha sido recientemente publicada por nuestro grupo (Gasa *et al.* 2017).

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que han hecho posible la realización de esta tesis. Creo que, en la mayoría de los casos, todas ellas son conscientes de lo mucho que se lo agradezco, pero nunca está de más que quede también por escrito.

Gracias a la Universitat Internacional de Catalunya, a las personas que la componen, por haberme dado la oportunidad de formarme, como investigadora y como docente. Gracias a toda la gente del departamento de Ciencias Básicas. Gracias especialmente a mis compañeros, tanto a los que forman parte del grupo de Josep Clotet como a los del grupo de Núria Casals. Todos ellos hacen que las largas jornadas de trabajo y las dificultades que a menudo se presentan sean muchísimo más fáciles de llevar.

Gracias en primer lugar a Josep Clotet, mi director de tesis. Si no hubieras confiado en mí, esto no habría sido posible. Así que quiero agradecerte la oportunidad, pero sobre todo lo mucho que me has enseñado, tu paciencia, tu pensamiento crítico y toda la ayuda que me has prestado en cualquier momento, porque a pesar de la cantidad cosas que te ocupan, siempre has estado disponible para todos nosotros.

También me gustaría dar las gracias a Javier Jiménez, porque la verdad es que te doy la lata cada vez que me asomo a tu despacho, a veces para cosas importantes y otras no tanto, pero como valoro mucho tu opinión, lo sigo haciendo.

A SaraH nunca le podré estar suficientemente agradecida. Tú sí que has tenido paciencia conmigo, y me has enseñado (casi) todo lo que sé. Te echo de menos, porque ha sido un orgullo trabajar contigo y compartir proyectos. Ha sido mejor aún compartir penas, birras y festivales. Y espero que aún nos queden unos cuantos.

Gracias a Samu, porque siempre supe que el bigotito que llevabas los primeros meses era postizo. Es genial tenerte por aquí de nuevo.

Martins y Palito, gracias por muchas cosas, entre otras, por dar por válida cualquier excusa para bajar a tomar unas cervezas. Sé que me llevo dos muy buenas amigas.

Gracias Abril, Mariana, Núria, Bárbara, Naty, Laura y Reyes por las risas, las penas, las quejas, los ánimos, las bromas y todos los buenos momentos dentro y fuera del lab.

AGRADECIMIENTOS

Mari Carmen, Bob, Eli, Ori y Sergio: esto era aún más divertido cuando estabais por aquí.

No me quiero olvidar de Núria, Rosi, Ruth, Cris, María, Miguel, Helena y Bea, que seguro que alguna duda me han resuelto, o me han dado restos de ratitas. Esas cosas.

Un abrazo a Bego, Lourdes y toda la gente de Psicología y Estadística, que ya que no hay pared divisoria, es menos evidente quién es lado claro y quién oscuro.

Y fuera de la UIC y del laboratorio, muchísimas gracias a mi familia de Tenerife, en especial a mi madre (sin tu apoyo esto no habría pasado) y a mi sister. Y también gracias a la familia de Barcelona (algunos del laboratorio también lo son): a mis amigos, pero sobre todo a Jonatan.

