Estudi de l'expressió d'RSK4 en tumors humans i la seva relació amb senescència

Laura López Vicente

Tesi doctoral

Vall d'Hebron Hospital

UAB Universitat Autònoma de Barcelona

Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Unitat de Bioquímica, Facultat de Medicina

Estudi de l'expressió d'RSK4 en tumors humans i la seva relació amb senescència

Memòria de tesi doctoral presentada per Laura López Vicente per optar al grau de doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Treball realitzat al Departament d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, sota la direcció del Dr. Santiago Ramón y Cajal Agüeras i de la Dra. Gemma Armengol Rosell.

Projecte subvencionat per Redes temáticas de Investigación Cooperativa en Salud (Ref. RD06/0020/0104), i per una beca predoctoral de l'Institut de Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron.

Barcelona, 2009

Doctoranda	Director	Codirector	Tutor
Laura López	Santiago Ramón y Cajal	Gemma Armengol	Anna Meseguer

Als meus pares,
al meu germà
i al Toni

La sabiduría es la más valiosa de las riquezas,
porque siempre te pueden arrebatar
cuanto seas capaz de aferrar entre las manos,
pero nunca te robarán
cuanto atesores en la cabeza.
El anillo verde
Alberto Vázquez-Figueroa

RESUM..... I
ABREVIATURES..... II
1.INTRODUCCIÓ..... 1
1.1 SENESCÈNCIA..... 3
1.2 CARACTERÍSTIQUES DE LES CÈL·LULES SENESCENTS..... 4
1.1.1 Parada de cicle cel·lular..... 4
1.2.2 Resistència a apoptosi..... 6
1.2.3 Expressió gènica alterada..... 6
1.3 MARCADORS DE SENESCÈNCIA..... 7
1.4 REGULACIÓ DE LA SENESCÈNCIA..... 9
1.4.1 La via de p53..... 9
1.4.2 La via de p16/RB..... 11
1.4.3 Vies dependents o independents?..... 11
1.5 INDUCTORS DE SENESCÈNCIA..... 12
1.5.1 Senescència induïda per dany en el DNA..... 12
1.5.2 Senescència induïda per l'activació d'oncogens..... 14
1.6 SIGNIFICAT DE LA SENESCÈNCIA *IN VIVO*..... 16
1.6.1 Senescència i càncer..... 17
1.6.2 Senescència i envelliment..... 19
1.6.3 Efecte pleiotròpic de la senescència..... 21
1.7 IDENTIFICACIÓ DE NOUS GENS IMPLICATS EN SENESCÈNCIA..... 22
1.8 RPS6KAs..... 23
1.9 RSKs..... 24
1.9.1 Processos cel·lulars regulats per RSKs..... 26
1.9.2 Malalties associades a RSKs..... 28
1.10 RSK4, CARACTERÍSTIQUES ESPECIALS..... 29
1.10.1 RSK4 i càncer..... 30
2. HIPÒTESI DE TREBALL..... 33
3.OBJECTIUS..... 37
4.MATERIAL I MÈTODES..... 41
4.1 OBTENCIÓ DE MOSTRES DE TUMORS..... 43

4.2 EXTRACCIÓ D'RNA..... 43
4.3 PCR AMB RETROTRANSCRIPTASA A TEMPS REAL..... 44
4.4 ANÀLISI ESTADÍSTICA..... 45
4.5 MANTENIMENT DE CULTIUS CEL·LULARS..... 45
4.6 PLÀSMIDS I CLONATGES..... 47
4.7 TRANSFECCIÓ DE siRNA..... 49
4.8 GENERACIÓ DE RETROVIRUS I INFECCIÓ..... 50
4.9 GENERACIÓ DE LENTIVIRUS..... 51
4.10 CORBES DE CREIXEMENT..... 52
4.11 CORBES DE RESISTÈNCIA A CISPLATÍ I PERÒXID D'HIDROGEN..... 52
4.12 ASSAIG DE FORMACIÓ DE COLÒNIES..... 53
4.13 TRACTAMENTS CEL·LULARS AMB SB203580 I N-ACETILCISTEÏNA..... 53
4.14 INDUCCIÓ DE SENESCÈNCIA..... 54
4.15 ACTIVITAT SA-β-GALACTOSIDASA..... 54
4.16 DETERMINACIÓ DE SAHF..... 54
4.16 EXTRACCIÓ DE PROTEÏNES I *WESTERN BLOT*..... 54
5 RESULTATS..... 57
5.1 EXPRESSIÓ D'RSK4 A TUMORS HUMANS..... 59
5.2 FUNCIÓ D'RSK4..... 63
5.2.1 La sobreexpressió d'RSK4 en línies cel·lulars de carcinoma de còlon indueix l'aturada de la proliferació cel·lular..... 63
5.2.2 La sobreexpressió d'RSK4 en la línia de fibroblasts IMR90 indueix l'aturada de la proliferació cel·lular..... 66
5.2.3 RSK4 indueix senescència en un nou model d'HDFs..... 67
5.3 REGULACIÓ D'RSK4 EN SENESCÈNCIA..... 68
5.3.1 L'expressió d'RSK4 incrementa en cèl·lules senescents..... 68
5.4 EFECTE *IN VITRO* DE LA INHIBICIÓ D'RSK4..... 70
5.4.1 Generació de línies cel·lulars sense expressió d'RSK4..... 70
5.4.2 La inhibició d'RSK4 retarda la senescència replicativa..... 72
5.4.3 La inhibició d'RSK4 indueix resistència a l'OIS..... 73

5.4.4 La inhibició d'RSK4 incrementa la resistència d'HDFs tractaments amb H_2O_2 i CDDP..... 73
5.4.5 La inhibició d'RSK4 incrementa la resistència d'HCT116 a tractaments amb CDDP però no amb H_2O_2..... 78
5.5 MECANISME D'ACCIÓ D'RSK4..... 78
5.5.1 La proteïna adenoviral E1A evita la senescència induïda per RSK4..... 78
5.5.2 La inhibició d'RB evita la senescència induïda per RSK4..... 80
5.5.3 RSK4 redueix el creixement de la línia de carcinoma de mama MDA-MB-468 però no indueix senescència..... 81
5.5.4 La inhibició de p21 evita la senescència induïda per RSK4..... 83
5.5.5 Ni la inhibició de ROS, ni la inhibició de p38MAPK eviten la senescència induïda per RSK4..... 83
6. DISCUSSIÓ..... 87
6.1 EXPRESSIÓ D'RSK4 A TUMORS HUMANS..... 89
6.2 FUNCIÓ D'RSK4..... 91
6.3 REGULACIÓ D'RSK4 EN SENESCÈNCIA..... 92
6.4 EFECTE IN VITRO DE LA INHIBICIÓ D'SK4..... 94
6.5 MECANISME D'ACCIÓ D'RSK4..... 99
6.6 IMPORTÀNCIA DE L'ESTUDI D'RSK4 EN CÀNCER..... 103
7. CONCLUSIONS..... 107
8. BIBLIOGRAFIA..... 111
9. ANNEX..... 121
10. AGRAÏMENTS..... 163

RESUM

RSK4 presenta una sèrie de diferències respecte a la resta de proteïnes de la família d'RSKs que el converteixen en un potencial gen supressor tumoral. RSK4 és una quinasa que es troba expressada i activa en situacions clíniques i fisiològiques específiques, com el desenvolupament embrionari, la parada del cicle cel·lular dependent de p53 i situacions de deprivació de sèrum. S'ha proposat que RSK4 és un inhibidor de la via de RAS-MAPKs i s´ha descrit que juga un important paper en el control de la invasió de carcinoma de mama. A més a més, al 2004 es va descriure que la inhibició d'RSK4 impedeix l'aturada del cicle cel·lular dependent de p53. L'aturada del cicle cel·lular permanent o senescència, s'ha descrit com una barrera a la transformació cel·lular ja que evita la proliferació de cèl·lules que han estat sotmeses a diferents tipus d'estrès potencialment cancerígens. La senescència està regulada principalment per les vies de p53 i p16/RB. En aquest treball s'han obtingut resultats que donen suport al paper d'RSK4 com a gen regulador de la senescència. La sobreexpressió d'RSK4 a models cel·lulars normals i de carcinoma de còlon induïa un fenotip característic de senescència independentment de l'estat de p53 i de p16.

Durant aquest estudi es va avaluar l'expressió d'RSK4 en tumors humans i es va observar per primera vegada que un alt percentatge de tumors renals i de còlon, així com de lesions benignes de còlon pateixen la inhibició de l'expressió d'aquest gen, suggerint que la inhibició d'RSK4 es produeix en fases inicials de la transformació tumoral. Per avaluar si la pèrdua d'RSK4 pot contribuir a la tumorigènesi es van realitzar diferents experiments *in vitro* fent servir RNAs d'interferència contra RSK4 i es va observar que la pèrdua d'expressió d'RSK4 representa per a la cèl·lula un avantatge proliferatiu que fa que aquestes cèl·lules siguin insensibles a senyals inductors de senescència, com l'activació d'oncogens o tractaments inductors de dany en el DNA. La pèrdua dels mecanismes reguladors de la senescència és un dels requeriments bàsics inicials en la transformació cel·lular. Els resultats obtinguts utilitzant RNAs d'interferència contra RB i p21 demostren per primera vegada que RSK4 pot participar en la via de senyalització que activaria RB a través de p21. Tot i que encara no s'ha establert el mecanisme exacte d'aquesta activació aquest estudi indica que és independent de p53 i de p16. L'existència de vies de senyalització que permetin l'activació d'RB, independentment de l'estatus de p53 i de p16, suposa una doble barrera de seguretat enfront de la transformació tumoral.

ABREVIATURES

CDDP: Cisplatí

CDKI: Inhibidor de quinases dependents de ciclines

CTK: Donini quinasa C-terminal

DDR: Resposta a dany en el DNA

DMSO: Dimetilsulfòxid

ETS: Marcadors de seqüència expressada

H_2O_2: Peròxid d'hidrogen

HDF: Fibroblasts humans diploides

hTERT: subunitat catalítica de la telomerasa

NTK: Domini quinasa N-terminal

OIS: Senescència induïda per oncogens

PCR: Reacció en cadena de la polimerasa

PD: *Population doublings*

PDL: *Population doublings level*

ROS: Espècies reactives d'oxigen

SA-β-gal: Activitat β-galactosidasa associada a senescència

shRNA: *short hair*pping RNA

siRNA: *small interference* RNA

RT-PCR: PCR amb retrotranscriptasa reversa

UV: Ultraviolada

INTRODUCCIÓ

1.1 Senescència

L'any 1964 Hayflick i Moorhead van observar que fibroblasts humans en cultiu patien una aturada permanent i irreversible del cicle cel·lular després d'unes quantes divisions, mentre que les cèl·lules tumorals proliferaven indefinidament [1]. Hayflick i Moorhead van hipotetitzar l'existència de factors cel·lulars que s'anaven perdent en les successives divisions cel·lulars fet que limitava la proliferació de les cèl·lules normals. Aquest punt on les cèl·lules deixen de proliferar es va anomenar "límit de Hayflick" [1] i va ser la primera observació del que avui dia anomenem senescència.

La senescència cel·lular es pot definir com un programa biològic que causa l'aturada permanent i irreversible del cicle cel·lular. La senescència es pot dividir en dos subtipus: la senescència replicativa i la senescència prematura induïda per estrès. La senescència replicativa és conseqüència de l'erosió o escurçament dels telòmers causat per la repetida replicació del DNA en absència de telomerasa. La senescència prematura induïda per estrès s'activa de forma ràpida en resposta a diferents tipus d'estrès extrínsec com dany en el DNA, dany a l'estructura de la cromatina, estrès oxidatiu o sobreexpressió d'oncoproteïnes [2-5] (Figura 1).

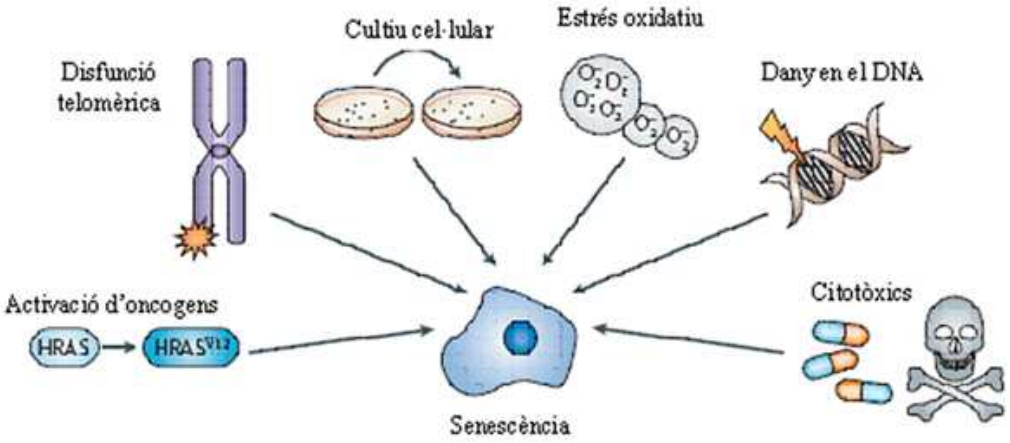


Figura 1. Molts camins cap a la senescència.
Diferents tipus d'estrès poden provocar l'activació de la senescència. La senescència replicativa s'activa com a conseqüència de la disfunció telomèrica, mentre que la senescència prematura o induïda per estrès s'activa com a conseqüència de l'activació d'oncogens o del dany en el DNA entre d'altres (Adaptat de ref. [5]).

Tot i que inicialment la senescència es va considerar com un efecte degut al manteniment en condicions subòptimes de les cèl·lules en cultiu, avui dia no hi ha cap dubte de que la senescència és un mecanisme cel·lular que ocorre *in vivo* i es considera una barrera enfront de la transformació cel·lular, ja que evita la proliferació de cèl·lules potencialment cancerígenes (amb disfunció telomèrica, dany en el DNA, activació d'oncogens, etc). Com es veurà més endavant, la senescència *in vivo* també s´ha relacionat amb l'envelliment i malalties relacionades amb l'edat.

1.2 Característiques de les cèl·lules senescents

Els organismes multicel·lulars tenen fonamentalment dos tipus cel·lulars diferents: cèl·lules postmitòtiques que no es poden dividir i cèl·lules mitòtiques que sí que poden. Els organismes complexes com els mamífers tenen cèl·lules mitòtiques a molts teixits somàtics amb la capacitat de renovació, reparació i en alguns casos regeneració. Aquestes capacitats de reparar i renovar es produeixen principalment incrementant la proliferació cel·lular, el que fa que aquests teixits siguin més susceptibles a desenvolupar malalties hiperproliferatives com el càncer. Les cèl·lules mitòtiques, però, també poden passar llargs intervals de temps en un estat reversible d'aturada de la proliferació anomenat quiescència. Les cèl·lules quiescents poden reprendre la proliferació en resposta als senyals apropiats, com la necessitat de reparació o regeneració. Aquestes cèl·lules mitòtiques són també les que poden entrar en un estat de senescència quan reben un estrès potencialment oncogènic. Les cèl·lules senescents són cèl·lules que no es poden dividir però continuen sent metabòlicament actives i presenten una sèrie de característiques que ens permeten la seva identificació (Figura 2).

1.2.1 Parada del cicle cel·lular

El tret més característic de les cèl·lules senescents és que es troben en una parada del cicle cel·lular, normalment amb un contingut de DNA característic de la fase G1. Un cop aturades, no poden reiniciar la replicació del DNA tot i tenir unes condicions de creixement adequades. La diferència entre les cèl·lules

senescents i les quiescents és que aquestes darreres poden respondre a estímuls proliferatius, mentre que les senescents no poden, ja que, excepte per manipulació experimental, aquest estat de senescència és irreversible.

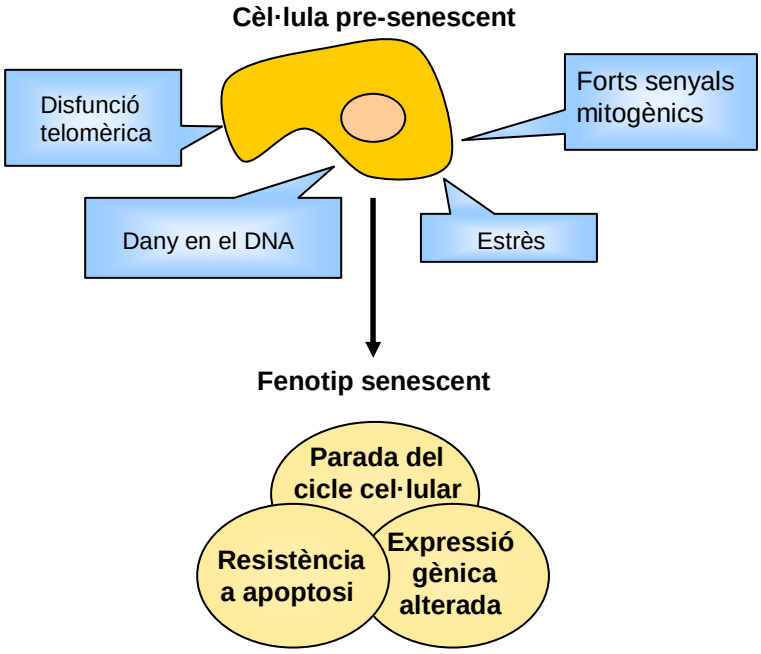


Figura 2. Fenotip senescent induït per múltiples estímuls.
Cèl·lules mitòticament competents poden respondre a diferents tipus d'estímuls activant la senescència cel·lular. Aquesta resposta comporta canvis en el fenotip cel·lular que inclouen una aturada del cicle cel·lular permanent, adquisició de resistència a l'apoptosi (en algunes cèl·lules) i un patró d'expressió gènic alterat. L'expressió o aparició de marcadors de senescència com canvis en l'estructura de l'heterocromatina o activitat β-galactosidasa no estan presents en aquest esquema ja que no són trets universals ni exclusius de l'estat de senescència (adaptat de ref. [6]).

Les característiques de l'aturada del cicle cel·lular poden ser diferents entre diferents tipus cel·lulars, depenent de l'espècie i del fons genètic. Per exemple, fibroblasts murins entren en senescència amb un contingut de DNA típic de la fase G1, però si tenen defectes en la quinasa activada per estrès MKK7, es paren amb un contingut de DNA típic de la fase G2/M [7]. La línia cel·lular d'osteosarcoma U2OS queda aturada tant en fase G1 com en fase G2/M després de tractar-la amb radiació ionitzant [8].

1.2.2 Resistència a apoptosi

L'apoptosi o mort cel·lular programada és una resposta enfront de l'estrès i del dany cel·lular i es considera, com la senescència, un important mecanisme supressor tumoral. Mentre que la senescència evita la proliferació de cèl·lules danyades, l'apoptosi les elimina. Molts tipus cel·lulars (però no tots) adquireixen resistència a certs senyals apoptòtics quan es tornen senescents. Per exemple, fibroblasts humans senescents són resistents a l'apoptosi induïda per deprivació de factors de creixement o estrès oxidatiu, però són sensibles als senyals apoptòtics induïts per FAS [9, 10]. Aquesta resistència a l'apoptosi en part pot ser deguda a canvis en l'expressió de proteïnes pro o antiapoptòtiques. Per exemple, després de tractar fibroblasts humans amb radiació ultraviolada (UV), la proteïna antiapoptòtica BCL-xL disminueix ràpidament en fibroblasts joves mentre que incrementa en fibroblasts envellits [11]. Tant l'apoptosi com la senescència comparteixen un efector comú, p53, que sembla ser important en aquesta resistència a l'apoptosi. En fibroblasts humans senescents s'ha observat que p53 es troba reclutat preferentment en promotors de gens relacionats amb aturada del cicle cel·lular (p21 i GADD45) en lloc de trobar-se en promotors de gens reguladors d'apoptosi [12].

Avui dia encara no està clar el que determina que una cèl·lula activi una resposta o una altra. Alguns factors importants semblen ser la natura i la intensitat del senyal així com el tipus cel·lular, ja que per exemple cèl·lules epitelials i fibroblasts danyats tendeixen a entrar en senescència mentre que limfòcits danyats tendeixen a apoptosi [6]. On no hi ha cap dubte és en que ambdues respostes són crucials en la supressió tumoral.

1.2.3 Expressió gènica alterada

Les cèl·lules senescents presenten una expressió gènica alterada, amb canvis importants en l'expressió de gens reguladors del cicle cel·lular. Les cèl·lules senescents expressen inhibidors de quinases depenents de ciclines (CDKIs) com p21 i p16. Aquestes CDKIs formen part de les vies de senyalització de p53 i de la proteïna del Retinoblastoma (RB), dues de les vies que amb més freqüència es troben alterades en càncer. Les cèl·lules senescents també reprimeixen l'expressió de gens que codifiquen proteïnes relacionades amb la

proliferació cel·lular, com c-FOS, ciclina A, ciclina B i PCNA. Però no tots els gens que es veuen alterats en senescència estan relacionats amb proliferació, moltes cèl·lules senescents sobreexpressen gens que codifiquen per proteïnes secretores que modifiquen la matriu extracel·lular, com IGF o PAI1 [6, 13]. Aquest increment en l'expressió de proteïnes secretores es coneix com fenotip secretor associat a senescència.

1.3 Marcadors de senescència

Tot i que són molts els marcadors que s´han descrit per la identificació de cèl·lules senescents tant *in vitro* com *in vivo* cap marcador és exclusiu de senescència.

Un marcador obvi per detectar senescència és la falta de replicació de DNA que es pot determinar per la incorporació de 5-bromodeoxiuridina (5-BRDU) o timidina-H^3 en cèl·lules en cultiu, o bé mitjançant immunotinció de proteïnes indicadores de proliferació com Ki-67. Aquests marcadors, però, no poden discriminar entre cèl·lules senescents, cèl·lules quiescents o cèl·lules diferenciades.

Un dels principals marcadors de senescència és l'activitat β-galactosidasa associada a senescència (SA-β-gal) que es pot detectar en moltes cèl·lules senescents a pH subòptim [14]. Es creu que aquesta activitat deriva de l'enzim lisosomal β-galactosidasa i reflexa un increment en la biogènesi lisosomal que es produeix freqüentment a les cèl·lules senescents [15]. Tot i que avui dia la detecció de SA-β-gal representa el principal marcador de senescència tant *in vitro* com *in vivo,* el fet que aquesta activitat sigui deguda a l'increment lisosomal fa pensar que pot ser un marcador no específic de senescència sinó específic d'aquelles alteracions que provoquin increment lisosomal [16].

La morfologia cel·lular també pot ser indicativa de senescència. En general, les cèl·lules senescents són molt més grans i presenten formes amples i irregulars així com un increment de grànuls en el citoplasma. Aquests canvis morfològics van ser particularment ben estudiats *in vitro* per Bayreuther *et al.* al 1988 [17], i tot i que són fàcilment observables en cèl·lules en cultiu, no succeeix el mateix *in vivo.*

L'expressió de proteïnes relacionades amb les vies de senyalització que indueixen senescència, com p21, p53, RB o p16 també es fan servir com a marcadors de senescència. Aquestes proteïnes però, no són específiques només de senescència i per exemple, p21 també es troba incrementada en cèl·lules quiescents. A més a més, s'ha observat que p16 es troba expressada en alguns tumors, especialment en aquells on la funció d'RB està alterada.

Un altre marcador que es fa servir per detectar senescència tant *in vitro* com *in vivo* és la detecció de focus d'heterocromatina presents en algunes cèl·lules senescents. Aquests focus d'heterocromatina s'anomenen SAHF (de l'anglès *Senescence Associated Heterochromatin Foci*) i consisteixen en una alteració global de l'estructura de la cromatina iniciada per RB i que comporta la inactivació permanent de gens crucials per la proliferació, com els regulats pels factors de transcripció de la família d'E2F. Aquestes modificacions de l'heterocromatina es poden visualitzar mitjançant tinció DAPI o mitjançant la immunotinció de proteïnes associades a SAHF, com la proteïna d'heterocromatina 1-γ (HP1-γ). La detecció de SAHF també es pot realitzar mitjançant la detecció de modificacions d'histones associades a heterocromatina com la trimetilació de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9me3) [6].

Al 2005 el grup de M. Serrano va identificar, a partir d'un estudi previ *in vitro,* nous marcadors per detectar senescència *in vivo* (en aquest cas, senescència induïda per l'activació de l'oncogèn *KRAS*) [18]. Entre tots els marcadors que van estudiar proposaven p15INK4b, DCR2 i DEC1 com a marcadors de senescència ja que es trobaven molt expressats en lesions premalignes de pell, pulmó i pàncrees mentre que no s'expressaven en lesions malignes. Aquests nous marcadors comporten un gran benefici en front de la detecció de SAHF i SA-β-gal ja que es poden detectar *in vivo* per immunohistoquímica a partir de teixit parafinat. Malgrat tot, calen més estudis ja que es van detectar en el cas concret de la senescència induïda per *KRAS*.

Així doncs, encara no existeix un únic marcador específic de senescència i actualment per determinar l'existència de cèl·lules senescents es fa servir una combinació de varis dels marcadors anomenats.

1.4 Regulació de la senescència

La senescència és un mecanisme complex activat per les cèl·lules en resposta a diferents tipus d'estrès. Aquesta resposta cel·lular té la finalitat d'aturar la proliferació de cèl·lules danyades per evitar que aquest dany es transmeti a les cèl·lules filles. Tot i que aquest mecanisme és complex i existeixen moltes proteïnes relacionades amb la senescència, avui dia no hi ha cap dubte de que la senescència s'estableix i es manté a través de dues grans vies de regulació, que són la via de p53 i la de p16/RB (Figura 3). Aquestes dues vies poden interaccionar però també poden aturar el cicle cel·lular de forma independent. S'ha proposat que segons el tipus d'estrès s'activaria una via o l'altra, i fins i tot s´ha observat que existeixen diferències entre espècies i tipus cel·lulars a l'hora d'activar la senescència [3, 6].

1.4.1 La via de p53

P53 s'activa principalment com a resposta a dany en el DNA (per exemple, per radiació ionitzant o disfunció telomèrica). Aquesta resposta està mediada per ATM/ATR i CHK1/CHK2, que causen l'estabilització post-traduccional de p53 a través de la seva fosforilació. P53, però, també es pot activar a través de $p14^{ARF}$ (ARF d'aquí en endavant). ARF es codifica en el locus INK4a/ARF. La transcripció d'aquest locus genera dos transcrits corresponents a ARF i p16. Aquests comparteixen dos exons però tenen dos promotors i el primer exó diferents i es tradueixen en una pauta de lectura alternativa [19]. ARF incrementa la vida mitja de p53 segrestant HDM2 en el nucli; HDM2 és una E3 ubiqüitin lligasa que media la degradació de p53.

L'activació de p53 té múltiples conseqüències en l'expressió gènica, potser la més rellevant és l'activació transcripcional de p21, un inhibidor del complex CiclinaE/CDK2, que provoca l'aturada del cicle cel·lular. El que determina si aquesta aturada del cicle cel·lular és reversible o acaba induint senescència continua sent una pregunta sense resposta. Una possibilitat seria la severitat del dany causat. Una reparació ràpida del DNA inhibiria la via de senyalització p53-p21, mentre que una reparació incorrecta, lenta o incompleta produiria un senyal sostingut que induiria senescència [6].

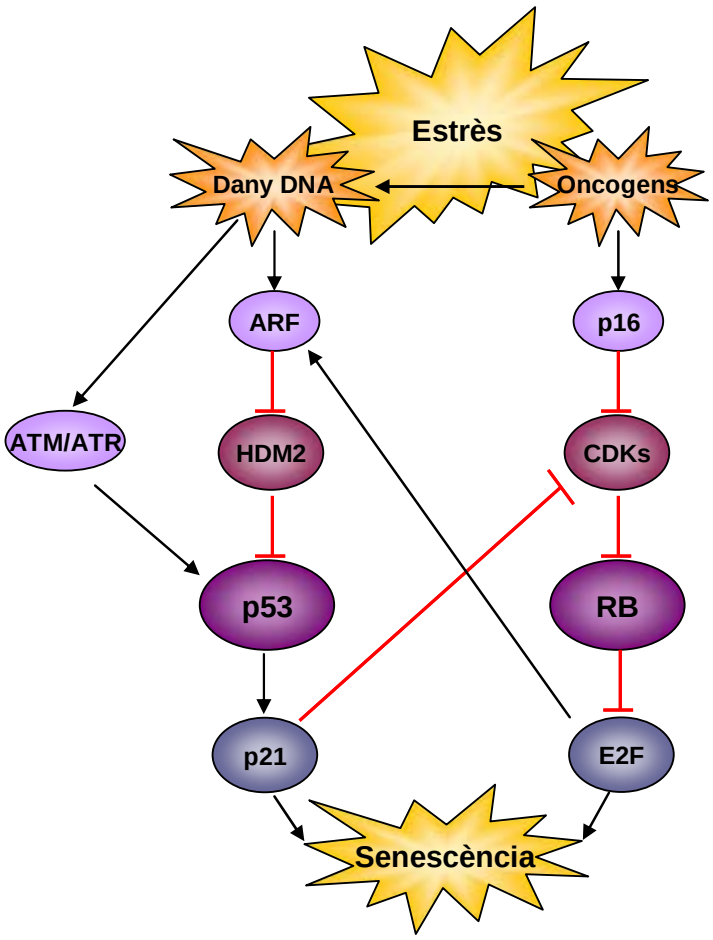


Figura 3. Control de la senescència per les vies de p53 i p16/RB.
Els senyals inductors de senescència, incloent dany en el DNA o activació d'oncogens, activen la via de p53 o la de p16/RB. Alguns senyals com l'activació d'oncogens poden activar les dues vies. P53 es pot activar a través d'ATM/ATR o a través d'ARF. ARF activa a p53 per la inhibició d'HDM2 que degrada a p53. Un cop actiu, p53 indueix senescència a través de p21. Alguns senyals d'estrès produeixen l'activació de p16. Tant p16 com p21 inhibeixen els complexes Ciclina/CDKs impedint la fosforilació d'RB. RB hipofosforilat suprimeix l'activitat d'E2F, factor de transcripció que regula l'expressió de gens necessaris per la progressió del cicle cel·lular. E2F també pot disminuir la proliferació activant l'expressió d'ARF (adaptat de ref. [6]).

En algunes cèl·lules en senescència replicativa, s´ha observat que la inactivació de p53 fa revertir la senescència. Aquesta manipulació experimental causa la represa de la proliferació cel·lular fins que les cèl·lules moren degut a la inestabilitat genòmica causada per la disfunció telomèrica, fenomen conegut com

crisi mitòtica [20]. Això ha fet que alguns autors parlin de la senescència mediada per p53 com a senescència reversible [21].

1.4.2 La via de p16/RB

La proteïna del Retinoblastoma o RB és activada principalment a través de p16, que pot ser activada per diferents tipus d'estrès, com l'activació de l'oncogèn *RAS*. P16 inhibeix el complex CiclinaD/CDK4,6 impedint la fosforilació inhibitòria de les CDKs sobre RB. En la seva forma hipofosforilada RB segresta i inhibeix E2F, factor de transcripció necessari per la proliferació cel·lular.

S'ha observat que l'activació de la via d'RB no només impedeix l'entrada al nucli d'E2F sinó que comporta l'aparició SAHF en regions dianes d'E2F i d'altres gens reguladors positius del cicle cel·lular, possiblement degut a la capacitat d'RB de formar complexes amb proteïnes modificadores de la cromatina [22]. Aquests focus d'heterocromatina impedeixen l'accessibilitat dels factors de transcripció al DNA produint-se una inactivació transcripcional permanent en aquestes regions. Un cop s´han establert els SAFHs ni p16 ni RB són necessaris [23]. Pel que fa a la reversibilitat d'aquesta via s´ha descrit que un cop la via de senyalització d'RB és activada, la senescència no pot ser revertida per la subseqüent inactivació de p53, de p16 o d'RB [20].

El gen de p16 es localitza, a l'igual que *ARF*, en el locus INK4a/ARF, i tot i que tots dos són mediadors centrals en senescència, encara no es coneix del tot la seva regulació transcripcional. La proteïna BMI1, membre de la família *polycomb*, pot reprimir tots dos gens i s'ha vist *downregulada* en senescència [3, 24]. Els factors de transcripció ETS són activadors de p16, mentre que les proteïnes TWIST i E2F3 són repressors d'ARF. TBX2, TBX3, JUNB i altres proteïnes també s'han vist implicades en la regulació del locus INK4a/ARF [3, 19]; no obstant això, aquestes interaccions encara estan poc caracteritzades i es necessiten més estudis per acabar de conèixer aquesta regulació.

1.4.3 Vies dependents o independents?

Existeixen diferents hipòtesis sobre si les dues grans vies de regulació de la senescència actuen de forma coordinada o actuen de forma independent. Com entre la majoria de vies de senyalització, entre la via de p53 i la d'RB també

existeixen connexions, tot i que no està clar si aquestes connexions són importants per a la inducció de la senescència.

El principal punt d'unió entre aquestes dues vies és p21. P21 és un inhibidor de CDKs més global que p16 i també pot activar a RB, però alguns estudis semblen indicar que les conseqüències d'activar RB a través de p21 són diferents a les d'activar RB a través de p16 [21]. S´ha observat que la inactivació de p53 pot induir proliferació en fibroblasts humans senescents que expressen p21 però no en aquells que expressen p16 [21]. A més a més, l'expressió ectòpica de p16 és més efectiva a l'hora d'induir senescència en fibroblasts humans que la de p21 [25] pel que sembla que p21 i p16 no tenen papers redundants.

En els darrers anys sembla que existeix un consens i es creu que per induir senescència les cèl·lules fan servir principalment una de les dues vies [6, 26]. Quina de les dues s'activa depèn del tipus cel·lular, de l'espècie i de l'estímul. Per exemple, la disrupció de telòmers activa la via de p53 en cèl·lules murines però activa tant la via de p53 com la d'RB en cèl·lules humanes [27]. També es creu que p53 regula principalment la senescència induïda per disfunció telomèrica o per dany en el DNA, mentre que la via de p16/RB regula la senescència induïda per altres tipus d'estrès com l'activació d'oncogens. No obstant això, existeixen moltes paradoxes pel que fa a la regulació de la senescència, i de fet s'ha observat que oncogens com *STAT5* o *RAS* causen dany en el DNA i activació de p53 [28].

1.5 Inductors de senescència

Els dos tipus de senescència més ben estudiats són la senescència induïda per dany en el DNA i la senescència induïda per activació d'oncogens.

1.5.1 Senescència induïda per dany en el DNA

Molts tipus d'estrès com la radiació o els citotòxics poden causar dany en el DNA, generant un fragment de DNA de cadena senzilla o provocant la ruptura de la doble hèlix. Aquests danys promouen l'activació de la via de senyalització de dany en el DNA o DDR (de l'anglès *DNA Damage Response*), que té dues

funcions diferents però coordinades: evitar la divisió de les cèl·lules per evitar que el dany es propagui a les cèl·lules filles; i participar en la reparació i manteniment de la integritat del DNA si és possible.

El DNA de cadena senzilla o les ruptures a la doble hèlix recluten i activen les quinases ATR i ATM al lloc del dany. Quan el dany en el DNA supera un cert llindar, CHK2 i CHK1 són fosforilades i activades per ATM i ATR. Llavors CHK1 i CHK2 difonen pel nucleoplasma i estenen la senyalització d'DDR fosforilant els seus substrats. Aquestes vies de senyalització acaben activant p53 que activa la transcripció de p21, el que resulta en una aturada estable del cicle cel·lular.

Pel que fa a la senescència replicativa, la disfunció telomèrica també activa la via de senyalització DDR. Els telòmers conformen una estructura formada per DNA replicatiu i proteïnes que protegeixen els extrems lineals dels cromosomes i els protegeix de la degradació i de la fusió amb altres cromosomes. Com la DNA polimerasa no pot replicar els extrems del DNA, a cada cicle de replicació es perden entre 50 i 200 pb del DNA telomèric. Els telòmers humans estan formats per 10-15 Kpb, el que permet que es puguin produir moltes divisions abans d'arribar a una llargada de telòmers que sigui crítica per la cèl·lula. La senescència replicativa no és deguda a que la mitjana de la longitud dels telòmers de tota la cèl·lula sigui baixa sinó que la presència d'uns pocs telòmers excessivament curts desencadena l'activació de la resposta DDR [29]. Recentment s´ha observat que l'activació d'ATM i ATR en aquest tipus de resposta és deguda a que el progressiu escurçament dels telòmers fa que es perdin proteïnes associades als telòmers que actuen com a inhibidores d'ATM i ATR [29].

Aquesta crisi deguda a l'escurçament dels telòmers pot ser pal·liada per l'acció de la telomerasa. Aquest enzim conté una subunitat catalítica (hTERT) i un component de RNA motlle que li permet d'afegir repeticions de DNA telomèric als extrems dels telòmers. La majoria de les cèl·lules normals no expressen telomerasa o l'expressen en poca quantitat; per contrast, cèl·lules de línies germinals i moltes cèl·lules cancerígenes expressen hTERT. A més a més, l'expressió ectòpica d'hTERT en fibroblasts humans evita la senescència replicativa però no evita la senescència deguda a dany en el DNA no telomèric o la senescència induïda per estrès [6, 30, 31].

1.5.2 Senescència induïda per l'activació d'oncogens

Es considera un oncogèn la versió mutada d'aquells gens (proto-oncogens) que participen en la regulació positiva de la proliferació cel·lular i de la supervivència i que tenen la capacitat de transformar a les cèl·lules si aquestes adquireixen més mutacions. En els darrers anys s´ha observat que les cèl·lules normals responen a l'activació de molts oncogens activant senescència (Taula1).

La senescència induïda per oncogens o OIS (de l'anglès *Oncogen Induced Senescence*) va ser observada per primera vegada l'any 1997 per Serrano *et al*. amb l'oncogèn *HRAS* en fibroblasts humans [32]. Avui dia existeixen moltes evidències de que la senescència induïda per oncogens és un fet que passa *in vivo* tant en models animals com en tumors humans [33-35].

En el cas de la regulació d'OIS, s'han descrit diferents hipòtesis. La sobreexpressió o l'expressió mutada d'alguns oncogens com *RAS* o *STAT5* causen dany en el DNA i per tant poden activar la via d'DDR [36]. Un model proposa que l'activació d'oncogens pot produir la generació d'espècies reactives d'oxigen o ROS (de l'anglès *Reactive Oxigen Species)* que poden danyar el DNA i per tant activar la resposta DDR [37]. De fet, la inactivació del gen seladin-1, que és un sensor de ROS, és suficient per evitar la senescència induïda per l'oncogèn *HRAS* en fibroblasts BJ [38]. Tot i que és ben conegut que els ROS poden induir dany en el DNA i que agents que produeixen l'acúmul de ROS poden induir senescència [39], encara no s´ha tancat el debat sobre com les espècies reactives intervenen en la senescència induïda per oncogens. Tot i aquestes evidències, existeixen oncogens com *RAF* i *MYC* [40, 41] que no produeixen ROS, per tant la relativa importància de ROS en la inducció d'OIS deu estar dictada per l'esdeveniment genètic específic i la intensitat del senyal.

Un altre model proposa que els oncogens causen dany en el DNA perquè produeixen una excessiva replicació. L'activació de l'oncogèn *HRAS* produeix un increment en el número d'orígens de replicació de DNA que es troben actius simultàniament, el que fa que es produeixin errors en la progressió de la forquilla de replicació que promouen l'activació d'ATR i ATM [29, 42]. Estudis de *time-course* mostren que l'expressió dels oncogens *HRAS, BRAF, E2F1* i *MYC* tenen una resposta bifàsica. En un primer moment es produeix una hiperproliferació, on les cèl·lules proliferen més ràpid que les control. Seguidament es produeix una

forta caiguda en la proliferació i s'estableix la senescència. L'activació de la resposta DDR coincideix en el temps amb la caiguda de la proliferació i per tant podria participar en la finalització del senyal hiperproliferatiu i activar la senescència [29].

Taula 1. Oncogens que indueixen senescència *in vivo* i *in vitro* [43].

Oncogèn	Context en el que indueix senescència	Tipus cel·lular on s´ha observat	Tumor/Teixit amb trets de senescència
RAS	Expressió d'al·lel mutat	HDF i MEF	Adenomes de pulmó; lesions ateroscleròtiques; hiperplàsia epitelial de mama
RAF	Expressió d'al·lel mutat	HDF, MEF,melanòcits	Adenoma de pulmó
AKT	Sobreexpressió	Cèl·lules endotelials i MEF	
E2F1/3	Sobreexpressió	HDF	Hiperplàsia glàndula pituitària
Ciclina E	Sobreexpressió	U2OS	
MOS	Sobreexpressió	HDF	
MYC	Sobreexpressió	Fibroblasts WRN	
CDC6	Sobreexpressió	HDF	

Abreviacions: HDF, fibroblasts humans diploides; MEF, fibroblasts humans murins; U2OS, línia d'osteosarcoma humana; WRN, síndrome de Werner.

Alguns estudis sobre OIS demostren que l'activació persistent de la via RAS-MAPKs (per *RAS* o *BRAF*) comporta l'activació de la via de p38MAPK, que indueix l'acumulació d'inhibidors de creixement (com p53 i p16), i finalment senescència [6, 44-46]. La via de p38 s'activa com a resposta a diferents tipus estrès, incloent els que causen dany en el DNA com la radiació UV, la radiació γ o la generació de ROS [3, 43, 46]. En el cas de la senescència induïda per *RAS* s´ha proposat que es produeix l'activació de p38 com a conseqüència del dany causat al DNA per l'activació prolongada de la via de RAS-MAPK [44].

Recentment s'ha publicat que de les quatre isoformes de p38, les isoformes α i γ són les que medien la senescència induïda per *RAS*. P38γ estimularia l'activació transcripcional de p53 per fosforilació directa; mentre que p38α induiria un increment de l'expressió de p16 [47].

L'any 2006 Courtois-Cox *et al.* [33] van proposar un nou model molt provocatiu on es considera que el que realment causa OIS és la inactivació de la via de RAS-MAPKs i no pas la hiperproliferació provocada per l'activació d'aquesta via. En aquest model es proposa que el senyal proliferatiu induït en un primer moment per l'activació de l'oncogèn *BRAF* és ràpidament reprimit per un mecanisme de *feedback* negatiu mediat per múltiples proteïnes que inclouen RASGAPs, RASGEFs, FOXO i fosfatases de les MAP quinases.

Tot i les complexitats dels mecanismes de regulació de l'OIS, cada una de les vies de senyalització esmentades juga un paper important sota un context experimental concret. El tema unificant és que totes aquestes vies comporten l'activació de p53 i RB a través de múltiples proteïnes com ATM, p38, p16, FOXO, etc. La simple activació de p53 i RB *per se* no és suficient per induir senescència, ja que la seva activació també s'observa en quiescència [43], el que indica que és necessària la participació d'altres proteïnes que transmetin el senyal de senescència.

1.6 Significat de la senescència *in vivo*

Tot i que Hayflick va descriure la senescència fa més de 40 anys, no és fins fa aproximadament una dècada quan apareixen evidències sobre cèl·lules senescents *in vivo.* En rosegadors, primats i humans, s´han trobat cèl·lules senescents a molts teixits renovables, com al sistema hematopoètic, als vasos sanguinis, a molts òrgans epitelials i a l'estroma [6]. Avui dia, la senescència es relaciona amb l'envelliment ja que les cèl·lules que expressen més d'un marcador de senescència són més freqüents en organismes adults que en joves i de fet s´han observat cèl·lules senescents a patologies relacionades amb l'edat, com a l'osteoartritis i l'aterosclerosi [6]. Així mateix també s´ha associat la presència de cèl·lules senescents amb lesions displàsiques benignes o preneoplàsiques però no en tumors malignes [6, 18, 48].

1.6.1 Senescència i càncer

El càncer és una malaltia que necessita de l'acúmul de múltiples alteracions per produir-se i per tant la supressió de la senescència per si sola no és suficient per induir la formació de tumors, no obstant sí que és un requisit inicial en el procés de la transformació [49]. Tot i que la identificació de cèl·lules senescents *in vivo* després de l'activació oncogènica no es va descriure fins fa poc, avui dia existeixen moltes evidències de que la senescència és un mecanisme de protecció inicial per frenar la tumorogènesi [4, 31, 50, 51] i els estudis fets per Weinberg i Hahn [52] van demostrar que el primer pas en la creació d'un model *in vitro* de càncer humà era la supressió de la senescència cel·lular (Figura 4).

En un model *knock in* condicional de *KRas* es va observar que els ratolins presentaven abundants cèl·lules senescents en lesions premalignes a pulmó, mentre que els adenocarcinomes eren completament negatius [18]. Recentment, fent servir un model de ratolí amb nivells d'expressió de *KRas* modulables, s´ha descrit que nivells fisiològics de *KRas* incrementen la proliferació cel·lular produint lesions hiperplàsiques [35]. Aquestes lesions no contenen cèl·lules senescents, el que indica que nivells baixos d'expressió de *KRas in vivo* no indueixen senescència. Per altra banda, nivells alts d'expressió de *KRas* sí que indueixen senescència (disminució de la proliferació, activitat SA-β-gal i increment de l'expressió de p53, p21 i p16) [35]. Aquests resultats semblen indicar que és la intensitat del senyal el que determina l'activació o no de la senescència i que és necessari superar un cert llindar perquè aquesta s'activi. Interessantment nivells alts de Ras no indueixen senescència en ratolins amb el locus INK4a-ARF delecionat [35].

En humans s´han identificat cèl·lules senescents en lesions benignes de pell que contenen *BRAF* mutat [31], en neurofibromatomes de pacients amb una mutació al gen *NF1* (que comporta l'activació constitutiva de RAS) [33], i a lesions benignes de pròstata [53]. Aquesta associació de cèl·lules senescents amb cèl·lules premalignes proporciona una oportunitat única per fer servir la senescència com a indicador de fases inicials de la tumorigènesi.

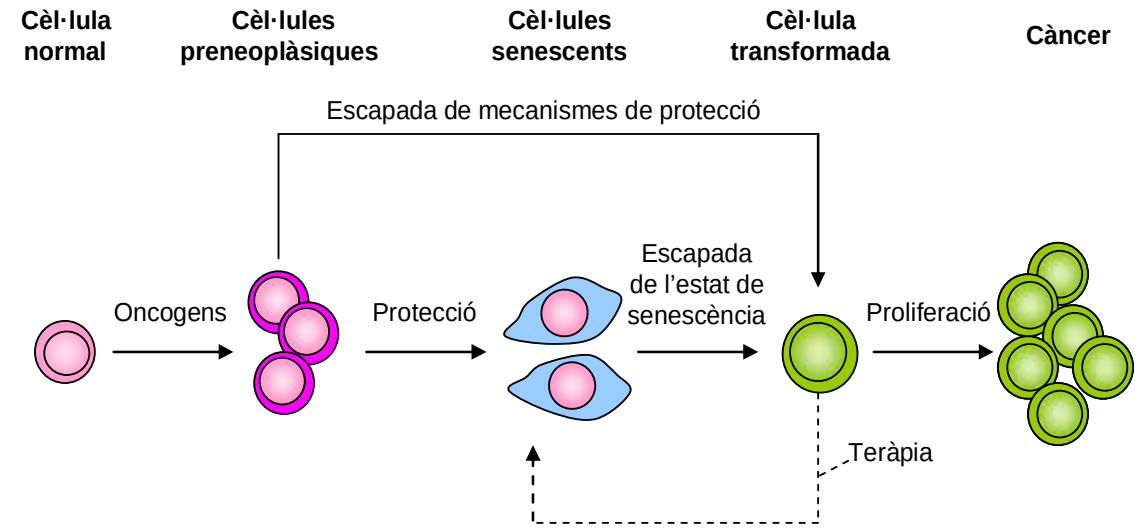


Figura 4. Model de transformació tumoral.

L'activació d'oncogens provoca inicialment un increment en la proliferació que pot activar la senescència. Degut a l'existència de cèl·lules insensibles a la senescència o de cèl·lules senescents que adquireixen noves mutacions, es produeix la transformació cel·lular i la progressió tumoral. Depenent de les mutacions que comprometen la senescència, aproximacions terapèutiques basades en manipulació genètica o quimioteràpics poden provocar l'activació de la senescència en cèl·lules transformades (adaptat de ref. [48]).

S'ha observat que les cèl·lules tumorals eviten la senescència replicativa a través de la sobreexpressió de telomerasa, o de forma menys freqüent activant mecanismes alternatius de manteniment dels telòmers [54]. La telomerasa, però, no evita la senescència prematura induïda per estrès, i perquè les cèl·lules puguin evadir la senescència són necessàries altres alteracions en les vies reguladores de senescència, com per exemple p53 o p16, dues de les proteïnes que es troben inhibides amb més freqüència en tumors humans. Tot i això, falta aclarir si les cèl·lules senescents presents a les lesions premalignes comparteixen totes les característiques de les cèl·lules senescents *in vitro*, en particular es desconeix si aquesta senescència *in vivo* també és irreversible. Fins al moment no se sap si l'increment de la proliferació de les cèl·lules a tumors avançats és el resultat de l'expansió d'una fracció de cèl·lules que mai han sigut senescents (possiblement cèl·lules mare resistents a senescència) o si ben al contrari és degut a cèl·lules que han escapat de la senescència per adquisició de

noves mutacions adquirides durant l'estat de senescència [6, 29] (Figura 4). En aquest sentit, tot i que l'adquisició de mutacions a cèl·lules no proliferants sembla un fet poc probable, ha sigut observat en cèl·lules quiescents [55].

Fins fa poc es creia que les cèl·lules tumorals havien perdut la capacitat d'activar senescència. Avui dia, però, s´ha vist que mitjançant manipulació genètica o tractaments amb citotòxics les cèl·lules tumorals es poden tornar senescents [56]. A models animals s´ha observat com la reexpressió de p53 en hepatocarcinomes o sarcomes fa revertir aquests tumors gràcies a la senescència [57, 58]. També s´ha observat que alguns quimioteràpics poden induir senescència *in vitro* en cèl·lules tumorals deficients en p16, com HCT116 i HT1080, i en línies deficients en p53, com SW480 i U251 [59]. Això implica que els senyals que indueixen senescència continuen presents en les cèl·lules tumorals i per tant la inducció de la senescència podria ser un possible tractament. L'any 2002 Poele *et al.* [60] van investigar per primer cop la correlació entre senescència i tractament quimioteràpic *in vivo.* En aquest estudi van fer servir seccions congelades de tumors de mama de pacients que havien rebut o no quimioteràpia neoadjuvant, i es va detectar que en 15 dels 36 tumors tractats (41%) hi havia cèl·lules senescents mentre que només 2 dels 20 tumors no tractats (10%) presentaven alguna cèl·lula senescent aïllada, suggerint que tractaments amb quimioteràpics poden induir senescència *in vivo*. Interessantment, el marcador de senescència SA-β-gal es trobava confinat en cèl·lules tumorals, mentre que el teixit normal era completament negatiu, indicant que la senescència induïda per quimioteràpia és una resposta específica de les cèl·lules tumorals [60].

1.6.2 Senescència i envelliment

A mesura que els organismes envelleixen les seves cèl·lules van acumulant divisions que poden causar l'escurçament de telòmers i per tant activar el mecanisme de senescència. La senescència pot contribuir a l'envelliment no només per l'acúmul net de cèl·lules senescents en els teixits comprometent la seva funcionalitat, sinó també limitant el potencial de regeneració dels *pools* de cèl·lules mare adultes (Figura 5).

Molts estudis descriuen en humans una correlació inversa entre longitud de telòmers i malalties associades a l'edat [2]. Aquesta relació es veu reforçada per diferents treballs en models murins, per exemple ratolins deficients en activitat telomerasa envelleixen prematurament [61].

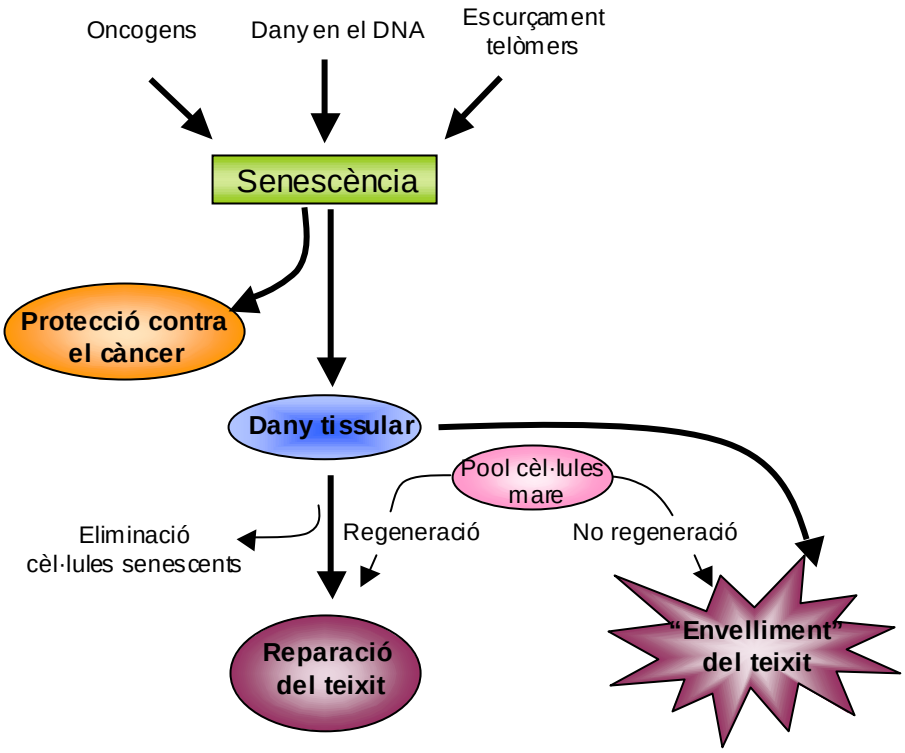


Figura 5. Senescència cel·lular. Balanç entre càncer i envelliment
La principal funció de la senescència és proporcionar protecció en front al càncer ja que el dany que causa la presència de cèl·lules senescents pot ser reparat pels processos normals de regeneració tissulars. La persistència de senylas inductors de senescència pot provocar que l'acúmul de cèl·lules senescents excedeixi la capacitat de regeneració de les cèl·lules mare produint l'envelliment tissular (Adaptat de ref. [2]).

El locus INK4a/ARF també sembla estar relacionat amb senescència i envelliment. Aquest locus s'expressa normalment a nivells molt baixos però amb l'edat es produeix un increment progressiu de la seva expressió en la majoria de teixits murins [62]. La forma com es desregula aquest locus no es coneix exactament. De tots els reguladors transcripcionals, n´hi ha dos que s'han relacionat amb la inducció de p16 relacionada amb envelliment. En concret, els

factors Ets1, reguladors positius de p16, incrementen durant la vida dels ratolins en paral·lel a la *upregulació* de p16 [62]. De forma similar, els nivells de BMI1, que es un potent inhibidor de p16, disminueixen en funció de l'edat en la pell humana [63].

Un altre mecanisme que relaciona p16 i envelliment és el dany oxidatiu i p38MAPK [44, 45]. S'ha observat a cèl·lules mare hematopoètiques que la generació de ROS activa l'expressió d'INK4a/ARF a través de p38MAPK. Com el dany oxidatiu incrementa amb l'edat, aquest podria ser un dels mecanismes responsables de l'increment de p16 que s'observa durant l'envelliment.

1.6.3 Efecte pleiotròpic de la senescència

Tot i que la senescència és una barrera en front a la transformació cel·lular sembla que la presència de cèl·lules senescents pot tenir a llarg termini alguns efectes deleteris (efecte pleiotròpic). Aquests han sigut relacionats amb el fenotip secretor de les cèl·lules senescents i amb la seva capacitat d'alterar el microambient. El tipus cel·lulars on més s´ha estudiat aquest efecte és en els fibroblasts, que són els encarregats de sintetitzar i mantenir el suport de tots els teixits epitelials renovables. Els fibroblasts senescents poden secretar metaloproteases, citoquines inflamatòries i factors de creixement epitelials. Així doncs, la senescència pot comprometre l'estructura i la funció d'un teixit degut a l'estimulació d'una resposta local inflamatòria i fins i tot pot afavorir la proliferació de cèl·lules preneoplàsiques degut als canvis en el microambient del teixit [21].

Alguns autors han explicat aquest paper pleiotròpic de la senescència des d'un punt de vista evolutiu. Aquesta teoria es basa en que el càncer és letal i per tant suposa un perill per la longevitat. L'evolució va paliar aquest perill amb mecanismes supressors tumorals. Un d'aquests mecanismes és la senescència. L'ambient en el que va evolucionar la senescència estava marcat pel perill als depredadors, les infeccions, etc. que provocaven la mort dels individus en edats primerenques. En aquest sentit la senescència només havia de ser efectiva en períodes relativament curts (poques dècades en humans i mesos en ratolins). En aquest ambient, els efectes deleteris de la senescència, per exemple la manca de capacitat de renovació dels teixits, tindrien poca pressió selectiva i per tant aquests efectes deleteris no es van eliminar [6]. Aquest concepte de processos

que poden ser beneficiaris en organismes joves, però deleteris en organismes adults es coneix com pleiotropia antagonística [64].

1.7 Identificació de nous gens implicats en senescència

Tot i els possibles efectes adversos, la senescència és un mecanisme supressor tumoral amb un gran potencial clínic tant pel seu possible ús com a indicador de progressió tumoral com pel seu ús terapèutic en càncer. Però per poder fer un bon ús clínic de la senescència és necessària la identificació de marcadors específics i un major coneixement de les vies de senyalització implicades en la inducció i el manteniment de la senescència tant en cèl·lules normals com en cèl·lules tumorals.

En els darrers anys una de les eines més emprades per trobar nous gens implicats en la senescència són els *arrays* genètics i l'ús de llibreries genòmiques. Un exemple és el treball realitzat per Berns *et. al.* l'any 2004 [8]. En aquest treball es va fer servir una llibreria d'RNAs d'interferència de 7941 gens humans amb l'objectiu d'identificar aquells gens la inhibició dels quals conferís resistència a l'aturada del cicle cel·lular dependent de p53. Per realitzar-ho van generar una línia de fibroblasts humans que contenien la subunitat catalítica de la telomerasa (hTERT) i un antigen T sensible a temperatura de manera que a 32ºC l'antigen T era actiu i inhibia p53 i RB permetent la proliferació; mentre que a 39ºC l'antigen T era inactiu i s'induïa l'aturada del cicle cel·lular. Amb aquest sistema es van identificar cinc nous gens la inhibició dels quals feia que les cèl·lules evitessin la parada de cicle cel·lular induïda per la temperatura i continuessin proliferant. Aquests gens eren: *RPS6KA6 (ribosomal S6 kinase 4, RSK4), HTATIP (histone acetyl transferase, TIP60), HDAC4 (histone deacetiylase 4), KIAA0828 (S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase, SAHH3) i CCT2 (T-complex protein 1, b-subunit)*. La inhibició d'aquests gens amb RNA d'interferència prevenia l'aturada del cicle cel·lular dependent de p53 i provocava una disminució en els nivells d'expressió de p21 [8]. Aquests fets obrien la possibilitat de que aquests gens fossin gens supressors tumorals i que juguessin un paper important regulant el cicle cel·lular i la senescència. Degut a que les alteracions en p53 ocorren en fases molt avançades dels tumors, es creu que hi

deuen haver altres alteracions que afectin la via de senyalització de p53 en les fases inicials del tumor i que aquestes alteracions són necessàries perqué es produeixi la transformació tumoral. Un treball previ realitzat en el nostre laboratori, on es va analitzar l'expressió d'aquests cinc gens en diferents tumors humans, va demostrar que es produeix una disminució significativa de l'expressió d'*RSK4* en carcinomes de còlon, suggerint que la pèrdua d'aquest gen podria afavorir la transformació tumoral [65].

1.8 RPS6KAs

RSK4 pertany a la família RPS6KAs (quinasa ribosomal S6 p90). Aquesta família de serina/treonina quinases està formada per 4 RSKs i 2 MSKs (*mitogen/stress activated protein kinase*). Les RSKs comparteixen entre elles un 72-82% d'homologia d'aminoàcids i un 39-42% amb les MSKs (amb un 61% d'homologia entre elles). Tant les RSKs com les MSKs comparteixen el fet únic de tenir dos dominis quinasa catalíticament funcionals. El domini quinasa N-terminal (NTK) de les RPS6KA comparteix homologia amb la família de les quinases AGC (PKA, PKG, PKC). El domini quinasa C-terminal (CTK) comparteix homologia amb la família de les quinases depenents de calci/calmodulina (CaMKs) [66].

Aquesta família de proteïnes participa en la via de senyalització de les MAPKs (*Mitogen-activated protein kinases*) (Figura 6). Aquesta via té un paper fonamental en la transducció de senyals des dels receptors de membrana fins al nucli i participa en proliferació, diferenciació, cicle cel·lular, creixement i apoptosi. Aquesta via de senyalització consisteix en una cascada de fosforilacions on les MAPK són fosforilades i activades per les MAPK-quinases (MAPKK), que al seu torn són activades per les MAPKK-quinases (MAPKKK). Les MAPKs més estudiades són les ERK1/2 (*Extracellular signal regulated kinase*), p38MAPK i JNK/SAPK (*Jun N-terminal kinase* o *Stress-activated protein kinase*). ERK és activada per estímuls mitogènics mentre que p38MAPK i JNK són activades per senyals d'estrès extracel·lular, com radiació UV, estrès oxidatiu o drogues citotòxiques. Les RSKs són el principal substrat d'ERK1/2 i per tant participen en la regulació de la proliferació cel·lular, la diferenciació i la supervivència [67].

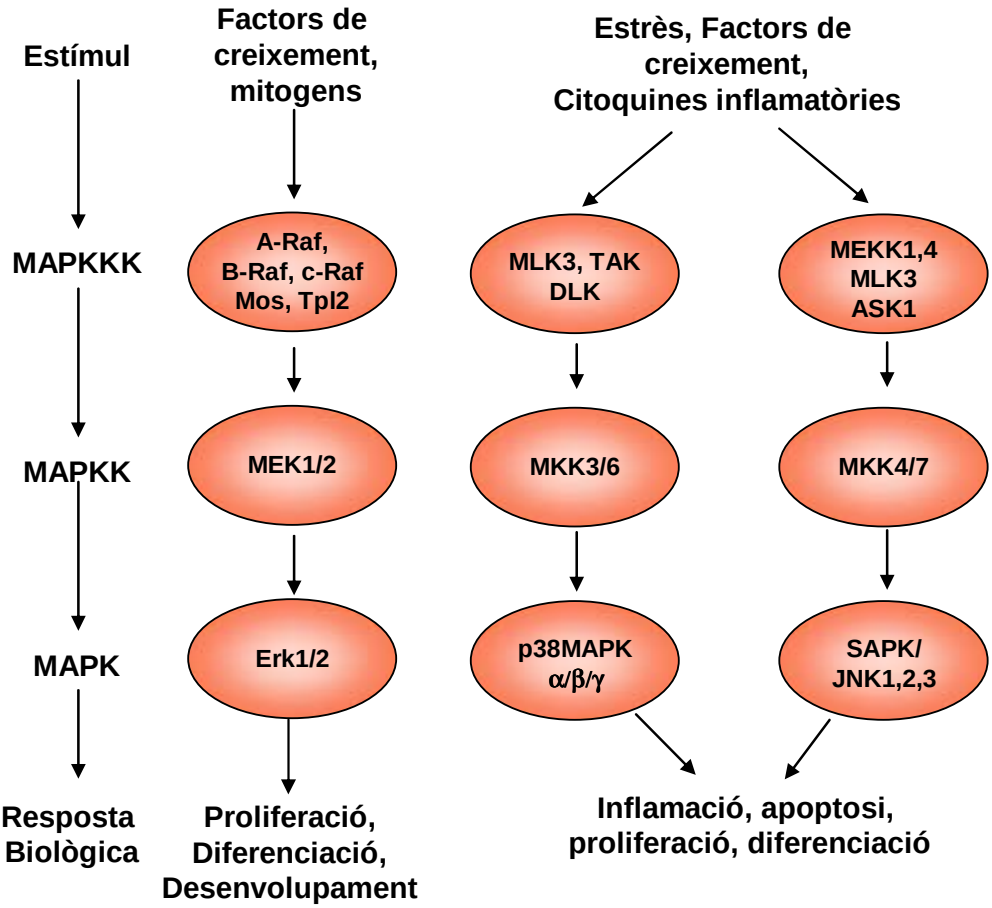


Figura 6. Vies de senyalització de MAPK.

Existeixen múltiples vies MAPK que controlen diferents respostes cel·lulars enfront de diversos senyals ambientals. Segons el tipus de senyal s'activa preferentment una via o un altra (adaptat de www.cellsignal.com).

1.9 RSKs

Com s´ha dit abans, RSK1-4 comparteixen un 72-82% d'homologia i tenen dos dominis quinasa catalíticament funcionals. El CTK és responsable de l'autofosforilació i el NTK de la fosforilació de substrats. Els dos dominis quinasa estan separats per una regió d'unió conservada. A més, a l'extrem C-terminal tenen un domini d'unió a ERK conegut com domini D [68].

El model actual d'activació de les RSKs diu que després de l'estimulació mitogènica d'ERK, aquest fosforila la treonina 573 (segons la nomenclatura d'RSK1) en el domini d'activació C terminal i la serina 363 de la regió d'unió. Això activa el domini CTK que s'autofosforila en la serina 380 creant un lloc d'unió per PDK1. Un cop PDK1 s'uneix a RSK fosforila la serina 221 del domini N-terminal completant l'activació del NTK. El domini NTK pot fosforilar el domini D modulant les interaccions amb ERK1/2 [66, 69] (Figura 7).

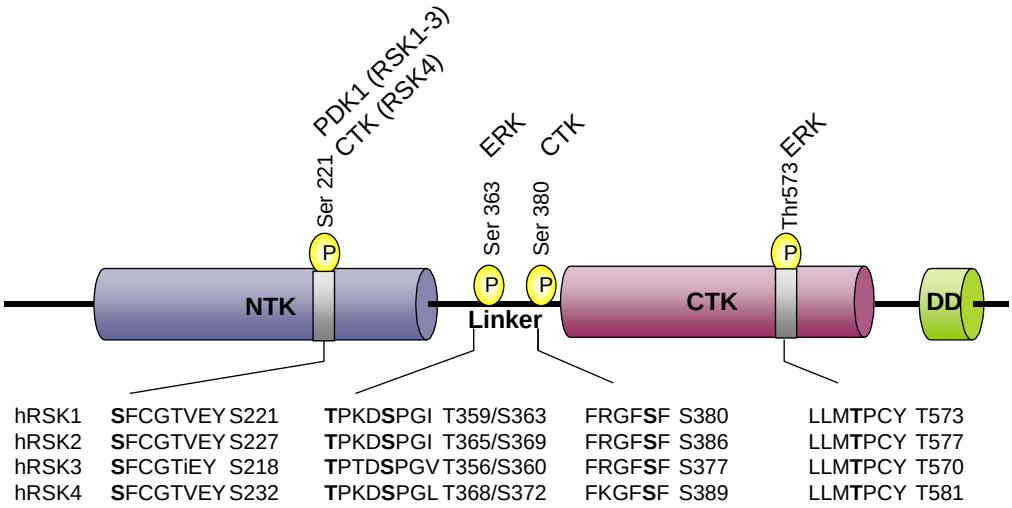


Figura 7. Estructura i llocs de fosforilació de RSKs

Les RSKs tenen dos dominis quinasa, el N-terminal o NTK i el C-terminal o CTK. Aquests dos dominis estan separats per una regió d'unió que conté un motiu hidrofòbic altament conservat. A l'extrem C-terminal trobem el domini D (DD) o domini d'unió a ERK. Amb P s'identifiquen els cinc llocs de fosforilació necessaris per l'activació de les RSKs (seguint la nomenclatura d'RSK1 humana); també s'indiquen les quinases que els fosforilen. Les dues caixes amb línies puntejades representen els llocs d'activació [68].

Altres quinases com p38MAPK, ERK5 o FGFR3 també han sigut descrites com a possibles reguladores d'RSKs. Per exemple, en cèl·lules dentrítiques RSK no només és activat per la via canònica d'ERK1/2, sinó que també ho és per p38MAPK a través de MK1 i 2. MK1 i MK2 són proteïnes amb un únic domini quinasa que presenta homologia amb el domini CTK de les RSKs i per tant pot actuar com ell [70]. RSK també es troba activat en cèl·lules que expressen la forma mutant activa de MEK5. Aquesta MAPK-quinasa és activadora d'ERK5, el

que indica que RSK en pot ser un substrat [71]. Finalment s´ha descrit que FGFR3 pot activar RSK2 mitjançant la fosforilació de la tirosina 529, el que facilita la seva unió i activació final per ERK [72] .

Fins al moment només una fosfatasa ha sigut associada a RSKs. PP2Cδ defosforila a RSK2 *in vivo* [73]. Aquesta interacció és específica ja que totes les isoformes d'RSKs i MSK poden associar-se a PP2Cδ, mentre que altres quinases relacionades amb aquesta família, com S6K, no poden [68].

Les formes inactives de les RSKs es troben tant en el citoplasma com en el nucli associades amb el seu activador ERK1/2 [68]. Alguns senyals extracel·lulars, com els factors de creixement, promouen l'activació de les ERKs al citoplasma i al nucli, i aquestes fosforilen i activen les RSKs. S´ha observat que després de l'activació, una fracció d'ERKs i RSKs es transloca del citoplasma al nucli per un mecanisme encara no definit, ja que només RSK3 té un clar senyal de localització nuclear. A diferència de la resta d'RSKs, RSK4 es va descriure inicialment com una proteïna citoplasmàtica [69] però recentment s'ha observat expressió d'RSK4 tant nuclear com citoplasmàtica en carcinoma de mama [74].

L'mRNA de *RSK1-3* és present a tots el teixits humans on s'ha estudiat, però existeixen variacions específiques en els nivells d'expressió que suggereixen que les diferents RSKs poden tenir papers específics. *RSK1* s'expressa principalment en el ronyó, pulmó i pàncrees. *RSK2* i *RSK3* s'expressen molt en múscul esquelètic, cor i pàncrees. Específicament al sistema nerviós humà *RSK1* s'expressa predominantment en el cerebel; *RSK2* en el cerebel, el pol occipital i el lòbul frontal; i *RSK3* a la medul·la [75]. RSK4 té una expressió molt més baixa en comparació a la resta d'RSKs. Estudis fets amb immunoblots en teixit de ratolí mostren expressió a cervell, cor, cerebel, ronyó i múscul esquelètic, mentre que no és detectable a pulmó, fetge, pàncrees i teixit adipós [69].

1.9.1 Processos cel·lulars regulats per RSKs

Les RSKs es troben distribuïdes en el citoplasma i en el nucli i participen en un gran nombre de processos per tota la cèl·lula. Un cop activades, es creu que les RSKs tenen un paper principalment estimulador del cicle cel·lular i de fet la seva

activació correlaciona amb la inducció de l'expressió de gens necessaris per l'inici del cicle cel·lular [66].

Per arribar a conèixer quines són les funcions específiques d'aquestes quinases és fonamental conèixer quins són els seus substrats. L'especificitat de substrats ha sigut analitzada mitjançant l'ús de llibreries peptídiques i s'ha determinat que el motiu de fosforilació diana dels substrats ha de ser Arg-X-Arg-X-X-pSer/Thr. Aquesta seqüència és compartida per altres quinases basòfiles com AKT, S6K1/2 i MSKs. Alguns dels substrats descrits inclouen proteïnes com FOS, GSK3, MITF, ERα, SOS i tuberina [68, 76].

Una de les funcions descrites de les RSKs és la participació en la proliferació cel·lular. S´ha observat que l'inhibidor del domini NTK de les RSKs SL0101 inhibeix la proliferació de cèl·lules de carcinoma de mama [77] i pròstata [78]. Algunes proteïnes a través de les quals les RSKs regulen la proliferació són GSK3α i β, NHE1, ERα i MITF. La fosforilació i inhibició de GSK resulta en l'estabilització de ciclina D1 i MYC, afavorint la progressió del cicle cel·lular i la supervivència. A més a més, RSK2 pot fosforilar a FOS incrementant la seva estabilització i afavorint la proliferació i la transformació cel·lular [76].

Les RSKs també poden afavorir la proliferació regulant el creixement cel·lular a través de factors relacionats amb la traducció de proteïnes. RSK1 pot fosforilar TSC2 inactivant la seva funció com a supressor tumoral i afavorint la senyalització d'mTOR i la traducció proteica. RSK1 també pot fosforilar un factor important en la maquinària de traducció, l'eIF4B. Aquesta fosforilació promou l'increment de la síntesi de proteïnes [68].

Les RSKs també poden estimular la supervivència cel·lular principalment a través de la fosforilació i inhibició de proteïnes pro-apoptòtiques com BAD i DAPK; o a través de l'activació de factors de transcripció que estimulen la síntesi de proteïnes anti-apoptòtiques, com l'activació del factor de transcripció CREB que activa la transcripció de BCL2 [68].

Però les RSKs també poden tenir un paper en la inhibició de la proliferació cel·lular, per exemple RSK2 pot fosforilar i inactivar a SOS comportant-se com un regulador negatiu de la via de senyalització de RAS-MAPKs [79]. A *Drosophila melanogaster*, que té un únic gen *RSK*, també s´ha observat que RSK actua com un inhibidor de la via Ras/MAPKs en processos de diferenciació cel·lular [80].

Finalment, com es veurà més endavant, RSK4 també sembla tenir un important paper en la inhibició de la proliferació cel·lular.

En un intent per conèixer millor l'especificitat de cadascuna de les isoformes d'RSKs s'han generat alguns models animals. Ratolins *knock out* per *Rsk1* i *Rsk3*, així com el triple *knock out Rsk1/Rsk2/Rsk3* són viables però no s'ha descrit més informació sobre el seu fenotip [81]. El *knock out* d'*Rsk2* ha estat el més ben estudiat i presenta una disminució de la capacitat cognitiva així com poca coordinació. Aquests animals desenvolupen osteopènia i són un 10-15% més petits que els animals control [82, 83].

La falta d'inhibidors específics per a cada una de les diferents isoformes de les RSKs ha fet molt difícil determinar si existeix algun tipus d'especificitat a l'hora de regular els diferents mecanismes cel·lulars en els que participen. L'ús d'RNAs d'interferència i altres estratègies d'inhibició en línies cel·lulars, cèl·lules mare i ratolins seran necessaris per poder respondre a aquesta pregunta.

1.9.2 Malalties associades a RSKs

Dos dels membres de la família de les RSKs, RSK2 i RSK4, tots dos localitzats al cromosoma X, han sigut relacionats amb malalties. RSK2 amb la síndrome de Coffin-Lowry (CLS) [84] i RSK4 amb retard mental lligat al cromosoma X [85].

El pacients amb CLS presenten retard mental, estatura petita i anomalies en l'estructura craneofacial i esquelètica. Aproximadament el 50 % de pacients amb CLS presenten mutacions en el gen *RSK2* [17]. Aquestes inclouen mutacions *missense* o *nonsense* en o al voltant dels llocs de fosforilació, llocs d'unió de l'ATP o del domini d'unió d'ERK, així com delecions intragèniques [84].

Les delecions en el cromosoma X estan freqüentment relacionades amb funcions mentals disminuïdes, que poden formar part de síndromes més complexes. Aquestes delecions es produeixen principalment en el locus Xq21. En la recerca de gens presents en aquest locus i per tant candidats a causar retard mental es va identificar el gen *RSK4,* però calen més estudis per establir una relació directa [85].

1.10 RSK4, característiques especials

RSK4 va ser l'últim membre en ser identificat de la família de les RPS6KAs [85] i fins al moment ha sigut objecte de poques investigacions. S'ha vist que RSK4, tot i pertànyer a la família de les RSKs, té un comportament diferent al de la resta de proteïnes de la família, ja que presenta diferències tant estructurals com funcionals, però encara es coneix molt poc sobre la seva funció.

A diferència de la resta d'isoformes de la família, la seva expressió és molt baixa i predomina en teixits com ronyó, cor, cervell, cerebel i múscul esquelètic [69]. El número de marcadors de seqüència expressada o EST (de l'anglès *Expressed sequence taqs*) d'*RSK4* a humans és extraordinàriament baix, 27 ESTs, comparat amb *RSK1* amb 384 ESTs, *RSK2* amb 225 ESTs o *RSK3* amb 314 ESTs (www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene).

Pel que fa al seu mecanisme d'activació, s'ha vist que RSK4 no respon als factors de creixement responsables de l'activació de la resta de RSKs. També s'ha descrit que RSK4 és actiu de forma constitutiva. Aquesta activació és deguda a que els nivells d'expressió d'RSK4 són tan baixos de forma normal que els nivells basals d'ERK són suficients per produir una fosforilació inicial que junt a la gran capacitat d'autofosforilació d'RSK4 fa que aquest sigui actiu sense la participació de PDK1 [69]. Aquestes característiques impliquen que RSK4 té propietats de senyalització diferents i és funcionalment distint a la resta d'RSKs.

Un estudi funcional amb mRNA de ratolí per identificar molècules que regulen la vies de Ras-MAPKs va demostrar que la injecció de l'mRNA d'*Rsk4*, però no el d'*Rsk1-3*, a oòcits de *Xenopus leavis* inhibeix la formació del mesoderm, que és induïda per la via de Ras-MAPKs [86]. L'acció inhibitòria d'Rsk4 sembla tenir lloc per sota de la cascada de senyalització de Ras, ja que disminueix tant la fosforilació de Mek com la d'Erk. A més a més, en embrions de ratolí, Rsk4 s'expressa a teixit extraembrionari, un teixit en el qual la regulació de la via Ras-MAPK és crítica per un correcte desenvolupament. Interessantment, Rsk4 i la forma activa d'Erk presenten una expressió inversa, a la regió on s'expressa Rsk4 no es troba la forma activa d'Erk i viceversa [86]. Aquests autors van proposar que a diferència de la resta d'RSKs, RSK4 és un inhibidor més que no pas un mediador de la via de senyalització de les MAPKs, tot i que encara no s'ha establert el mecanisme exacte d'inhibició.

A nivell transcripcional s´ha descrit un factor de transcripció que pot regular l'expressió d'*RSK4*. HNF4α és un factor de transcripció que s'expressa a teixits com còlon, intestí i ronyó, i que és responsable de la diferenciació de les cèl·lules epitelials. S'ha observat que la disfunció d'HNF4α fa que disminueixin els nivells d'expressió d'*RSK4* i provoca desordres metabòlics incloent neuropaties i nefropaties diabètiques [87]. Recentment també s'ha descrit que c-MYC pot regular l'expressió d'*RSK4* [88].

1.10.1 RSK4 i càncer

Fins al moment són molt pocs els estudis realitzats sobre RSK4 i la seva relació amb càncer però existeixen algunes evidències que fan pensar que RSK4 participa en la regulació de la proliferació i la invasivitat.

Al 2005, Takhur *et al.* [89] van observar que ratolins transgènics que expressaven c-Myc (MMTV-c-Myc) presentaven un increment en l'expressió d-Rsk4 als tumors de mama en comparació amb mames normals i amb mames de ratolins transgènics per TGFα. Tenint present que els tumors dels ratolins MMTV-c-Myc no són invasius i no fan metàstasi, els autors proposaven que aquest fenotip pot ser degut a l'increment de l'expressió d'*Rsk4*, que és induit per c-Myc.

Recentment s'ha descrit que la sobreexpressió d'RSK4 resulta en una disminució de l'activitat invasiva i migratòria de la línia cel·lular de carcinoma de mama MDA-MB-231 tant *in vitro* com *in vivo* [88], implicant a RSK4 en el control de la invasió i la metàstasi en càncer de mama possiblement per la capacitat d'RSK4 de regular claudina-2. Aquesta proteïna pertany a la família de claudines, formada per 23 membres i participa en el manteniment de les unions *tight* entre cèl·lules epitelials. La inhibició d'RSK4 disminueix l'expressió de claudina 2 el que s´ha relacionat amb la transició epiteli-mesenquima [88]. No obstant, no s´ha establert si l'efecte d'RSK4 sobre claudina 2 és directe o indirecte.

Un dels pocs estudis d'RSK4 en tumors humans, és un treball realitzat al nostre laboratori, en el qual es van determinar els nivells d'expressió d'*RSK4* en tumors humans de còlon, pulmó i pròstata [65]. Aquest estudi va demostrar que es produeix una disminució significativa de l'expressió de l'mRNA d'*RSK4* en carcinomes de còlon en relació a la seva expressió a la mucosa sana adjacent. En un altre estudi realitzat per Thakur *et al*. [88] amb mostres de carcinoma de

mama es va observar pèrdua o reducció de l'expressió de *RSK4* en més del 50% dels casos analitzats en comparació amb el teixit sa adjacent. De fet, la regió cromosòmica Xq21 on es localitza *RSK4*, és una regió on s´han observat delecions en nombrosos pacients amb càncer [88].

HIPÒTESI DE TREBALL

L'estudi de les vies bioquímiques que controlen i regulen la senescència es considera clau per entendre les primeres fases de la transformació i immortalització cel·lular, així com per identificar factors que sensibilitzin les cèl·lules a tractaments antitumorals. Donat que les dues vies clàssiques identificades fins avui dia que regulen la senescència són les de p53 i RB i donat que les alteraions de p53 no són un fet precoç en la transformació tumoral, es creu que deuen existir altres factors o alteracions genètiques que contraresten la senescència a les primeres fases de la transformació tumoral.

En aquest sentit, la recerca realitzada per Berns *et al.* [8] per identificar nous components de la via de p53 va servir per identificar el gen *RSK4* com un nou mediador d'aquesta via. RSK4 era necessari per l'aturada del cicle cel·lular dependent de p53, el que feia pensar en RSK4 com un mediador dels senyals regulats per p53, com per exemple la senescència.

Un estudi preliminar realitzat en el nostre grup va observar que el gen *RSK4* estava *downregulat* en tumors de còlon. Aquesta dada, junt amb les escasses referències del gen *RSK4,* que el defineixen com un inhibidor de la via RAS-MAPKs, i la seva relació amb p53, ens va plantejar la hipotèsi de que *RSK4* pot ser un rellevant gen supressor tumoral, que participa en la regulació de la senescència en les primeres fases de la transformació tumoral.

OBJECTIUS

L'objectiu principal d'aquest estudi és determinar si RSK4 participa en la regulació de la senescència i determinar si la pèrdua de la seva expressió pot ser un factor important en el procés de transformació cel·lular.

Els objectius concrets són:

1. Determinar si els nivells d'expressió d'*RSK4* a nivell d'mRNA i de proteïna són diferents a tumors humans comparats amb teixit normal.

    1.1 Identificar bons gens de referència que ens permetin comparar l'expressió de l'mRNA d'RSK4 entre mostres procedents de teixit normal i de teixit tumoral per PCR amb retrotranscriptasa a temps real.

    1.2 Determinar l'expressió d'*RSK4* a nivell d'mRNA a carcinomes renals i de còlon i relacionar-ho amb els nivells d'expressió de proteïna.

    1.3 Comparar l'expressió d'*RSK4* a diferents estadiatges de la transformació cel·lular.

2. Determinar la funció d'RSK4 mitjançant la seva sobreexpressió a diferents models cel·lulars.

    2.1 Estudiar l'efecte de la sobreexpressió d'RSK4 a un model cel·lular de carcinoma de còlon amb baixa expressió endògena d'RSK4 i determinar si aquest efecte és dependent de p53.

    2.2 Validar els resultats obtinguts en el punt 2.1 sobreexpressant RSK4 en models cel·lulars normals.

3. Analitzar si l'expressió endògena d'*RSK4* es veu alterada en cèl·lules senescents.

4. Estudiar *in vitro* l'efecte de la pèrdua d'expressió d'RSK4.

    4.1 Analitzar com afecta la inhibició d'RSK4 a la senescència replicativa.

    4.2 Analitzar com afecta la inhibició d'RSK4 a la senescència induïda per oncogens (*BRAF* i *KRAS*).

    4.3 Analitzar si la inhibició d'RSK4 confereix resistència a tractaments amb peròxid d'hidrogen i cisplatí.

5. Determinar les vies bioquímiques per les quals actua RSK4

5.1 Determinar si RSK4 actua a través d'RB

5.1.1 Evaluar l'efecte de la coexpressió d'RSK4 i la proteïna adenoviral E1A en IMR90.

5.2.2 Evaluar l'efecte de la sobreexpressió d'RSK4 a un model cel·lulars amb inhibició d'RB.

5.3.3 Evaluar l'efecte de la sobreexpressió d'RSK4 a un model cel·lular amb *RB* mutat.

5.2 Determinar si RSK4 actua a través de p21

5.3 Determinar si RSK4 actua a través de p38MAPK o de la generació de ROS

MATERIAL I MÈTODES

4.1 Obtenció de mostres de tumors

Es van seleccionar a l'atzar mostres de teixit normal i teixit tumoral de 30 pacients amb carcinoma de còlon i de 20 pacients amb carcinoma renal de cèl·lules clares procedents del banc de tumors del Departament d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona. També es van seleccionar mostres de 7 adenomes de còlon. Quinze de les mostres de còlon havien sigut prèviament analitzades per la Dra. M. Lleonart (Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona) [65]. Tots els procediments de l'estudi van ser aprovats pel Comitè ètic de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron.

Les mostres utilitzades per aquest estudi van ser recollides de forma rutinària pel servei d'Anatomia Patològica com s'indica a continuació: un cop avaluat el tumor i realitzat el diagnòstic, es pren una mostra destinada al banc de tumors només en els casos en que hi ha prou material. Aquesta mostra es secciona en tres parts: dues parts es congelen en nitrogen líquid i la tercera es congela en un criomotlle amb OCT. D'aquest criomotlle es realitza un tall en el criostat, que és valorat per un patòleg per confirmar el diagnòstic del material congelat. El mateix procediment es realitza amb el teixit sa.

4.2 Extracció d'RNA

L'extracció de l'RNA total del teixit fresc congelat en nitrogen líquid es va realitzar amb l'*RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanya). El teixit fresc congelat es va triturar amb nitrogen líquid en un morter que es va netejar prèviament amb H_2O-Dietilpirocarbonada i RNase Zap (Ambion, Austin, TX) per evitar la degradació de l'RNA. Un cop pulveritzat el teixit es va dipositar ràpidament en un eppendorf sense RNases i es va homogeneïtzar amb el tampó de lisi (*RNeasy Mini Kit*) passant el lisat almenys cinc cops per un xeringa sense RNases amb una agulla de 0.7 x 30 mm. Després es van seguir les instruccions del fabricant per obtenir RNA total. La quantificació i la integritat de l'RNA es van determinar amb l'*RNA nano Lab Chip Kit Bioanalyzer* (Agilent, Palo Alto, CA).

4.3 PCR amb retrotranscriptasa a temps real

Per determinar la quantificació relativa de l'mRNA d'*RSK4* en els tumors i al teixit normal es va realitzar una PCR amb retrotranscriptasa (RT-PCR) a temps real amb l'equip ABI PRISM 7000 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Foster City, CA). La quantificació relativa ens permet conèixer si un gen està més o menys expressat en una mostra problema (tumor) respecte a una mostra calibradora (teixit sa) en relació a un gen de referència (gen que no veu la seva expressió alterada ni pel tipus de mostra ni pel tipus de tractament) que es fa servir per normalitzar els resultats.

Per determinar quin gen de referència era el més adequat per comparar mostres tumorals amb mostres normals, per cada tipus de teixit (còlon i ronyó) es va realitzar un assaig *Taqman Endogenous Control Assay* (Applied Biosystems) segons les instruccions del fabricant. Amb aquest sistema es va analitzar l'expressió de 16 gens de referència i es va determinar que per les mostres a estudiar el gen *POLR2* era el gen que mantenia l'expressió més constant entre el tumor i la mucosa normal en teixit de còlon i el gen *PPIA* ho era pel teixit de ronyó.

La RT-PCR a temps real es va realitzar en dos passos. Primer es va realitzar la síntesi de cDNA de cadena senzilla amb el *SuperScriptII reverse transcriptase kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA) a partir d'1.5 μg d'RNA total, amb 200 ng de *Random Primers,* dNTPs 0.5 mM i H_2O destil·lada fins a 12 μl . Aquesta reacció es va escalfar 5 min a 65ºC, després s'hi va afegir el Tampó de Reacció 1x, DTT 10 mM i 40 U de *RNaseOUT* i es va incubar 2 min a 25ºC. Es van afegir 200 U de *SuperScriptII reverse transcriptase* i es va incubar 10 min a 25ºC i 50 min a 42ºC. Finalment la reacció es va inactivar escalfant a 70ºC 15 min. Les alíquotes de cDNA es van guardar a –20ºC. En un segon pas es va realitzar la PCR a temps real. Cada mostra es va analitzar per triplicat a partir de 15 ng de cDNA, 1μl de les sondes Taqman Hs00179523_m1 per *RSK4*, Hs00172187_m1 per *POLR2* i 4326316E per *PPIA* i 10 μl de *TaqMan Universal PCR Master Mix* (*20xTaqMan Gene Expression Assays*, Applied Biosystems). La reacció de PCR va ser de 2 min a 50ºC, 10 min a 95ºC i 40 cicles de 15 s a 95ºC i 1 minut a 60ºC.

Per avaluar l'expressió relativa d'*RSK4* es va fer servir el mètode comparatiu *RQ Study*. Aquest mètode requereix que tant el gen diana (*RSK4*) com els gens de referència (*POLR2* i *PPIA*) tinguin la mateixa eficiència d'amplificació a qualsevol

rang de concentració (*Abi Prism 7000 RQ Plate and RQ Study, User Guide*). Aquest mètode fa servir fórmules aritmètiques per calcular el valor d'expressió relativa del gen diana (RQ) a la mostra problema (en aquest cas teixit tumoral), normalitzat amb el gen de referència i relatiu a un calibrador (en aquest cas teixit normal). El valor RQ es calcula segons la fórmula $RQ= 2^{-\Delta\Delta CT}$ i $\Delta\Delta C_{T=}[C_{T\ (tumor,\ RSK4)} - C_{T(teixit\ normal,\ RSK4)}]-[C_{T(tumor,\ gen\ referència)}-C_{T(teixit\ normal,\ gen\ referència)}]$, on C_T és el cicle de PCR on l'amplificació del gen (diana o de referència) assoleix un llindar fixat. Aquesta anàlisi es va realitzar amb el *software RQ Manager* (Applied biosystems). Totes les mostres es van analitzar per triplicat.

4.4 Anàlisi estadística

Les comparacions estadístiques es van realitzar amb el software *Statistical Package for Social Sciences*, versió 11.5 (SPSS, Inc., Chicago, IL). El test no paramètric de Wilcoxon es va utilitzar per comparar les diferències d'expressió d'RSK4 entre teixit normal i tumoral.

4.5 Manteniment de cultius cel·lulars

Per realitzar aquest treball es van seleccionar models cel·lulars amb característiques genètiques diferents, que es van tenir en compte a l'hora de valorar els resultats obtinguts (Taula 2). Les línies cel·lulars utilitzades van ser:

-HCT116 p53wt: Línia cel·lular humana de carcinoma de còlon, amb expressió de p53 *wildtype* (p53wt), amablement cedida pel Dr. B. Vogelstein (The John Hopkins Oncology Center, Baltimore, MD).

-HCT116 p53null: Línia cel·lular humana de carcinoma de còlon, sense expressió de p53 (p53null), amablement cedida pel Dr. B. Vogelstein.

-IMR90: Línia cel·lular de fibroblasts humans primaris de pulmó (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK).

-TIG3: Línia de fibroblasts fetals diploides de pulmó immortalitzada amb la subunitat catalítica de la telomerasa hTERT. Aquesta línia va ser generada i amablement cedida pel Dr. D. Peeper (The Netherlands Cancer Instute, Amsterdam, Holanda).

-TIG3 p16null: Línia cel·lular estable sense expressió de p16 (p16null) derivada de la línia TIG3. Aquesta línia va ser generada i cedida pel Dr. D. Peeper.

-IMR90-Tx-E1A: Línia cel·lular derivada de les IMR90 amb activació d'E1A de forma induïda amb tamoxifè. Aquesta línia va ser generada en el laboratori per la doctoranda E. Argelaguet.

-MDA-MB-468: Línia cel·lular de carcinoma de mama (American Type Culture Collection, Manassas, VA).

-HEK293T: Línia cel·lular embrionària de ronyó amb expressió de l'antigen T de l'adenovirus SV40 (American Type Culture Collection).

-GP2: Línia cel·lular productora de retrovirus amb expressió estable dels gens *gag* i *pol* del virus de la leucèmia murina Moloney (Clontech, Heidelberg, Alemanya).

Taula 2. Característiques del models cel·lulars (segons www.sanger.ac.uk).

Línia cel·lular	Mutacions	Altres característiques
HCT116 p53wt	*p16*; *KRAS*; catenina β1; *MLH1*;*PI3K*	
HCT116 p53null	*p16*; *KRAS*; catenina β1; *MLH1*;*PI3K*	No expressa p53
IMR90	No	
TIG3	No	Expressa hTERT i receptor ecotròpic
TIG3 p16null	No	No expressa p16; expressa hTERT i receptor ecotròpic
IMR90-Tx-E1A	No	Activació induïble d'E1A
MDA-MB-468	*RB*; *PTEN*; *p53*; *SMAD4*	
HEK293T*		Línia cel·lular productora de lentivirus
GP2*		Línia cel·lular productora de retrovirus

*****Les mutacions de les línies HEK29T i GP2 no es van tenir en consideració ja que aquests models cel·lulars només es van fer servir com a productors de virus.

Totes les línies cel·lulars es van cultivar en medi DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium* amb 4.5 g/l de Glucosa i 30 mg/l de L-Glutamina; Cambrex, Barcelona, Espanya) suplementat amb 10% de sèrum fetal boví (Labclínics, Barcelona, Espanya), 100 U/ml de penicilina, 100 μg/ml d'estreptomicina, 0.25 μg/ml d'amfotericina B i HEPES 10 mM (Cambrex, Verviers**,** Belgium). Les línies HCT116 p53wt i p53null es van mantenir en cultiu amb suplement de 200 μg/ml de G418 (Invivogen, Toulouse, França).

El cultiu de les línies cel·lulars es va realitzar en condicions d'esterilitat en una cabina de flux laminar vertical. Periòdicament, es van obtenir sobrenedants dels cultius per detectar la presència de micoplasma utilitzant el test *EZ-PCR Mycoplasma Test Kit* (Biological Industries, Haemek, Israel) segons les instruccions del fabricant.

4.6 Plàsmids i Clonatges

Els plàsmids utilitzats per realitzar aquest treball van ser:

pLPCX-GFP i pLPCX-RSK4

Per induir la sobreexpressió d'RSK4 en els diferents models cel·lulars es va fer servir el vector retroviral amb resistència a puromicina pLPCX-RSK4 i el vector pLPCX-GFP s´ha fet servir com a control. Aquest últim va ser amablement donat pel Dr. S. Gutkind (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

El vector pLPCX-RSK4 es va generar a partir del vector pLPCX (Clontech), el vector pcDNA3.1-Higro-RSK4, cedit amablement pel Dr. R. Bernards (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Holanda) i el vector pCR2.1 (Invitrogen). A partir del vector d'expressió pcDNA3.1-Higro-RSK4, RSK4 es va amplificar per PCR amb els primers universals T7 i BGH (Invitrogen) que flanquegen el lloc de multiclonatge del vector pcDNA3.1-Higro. El producte de la PCR es va lligar en el vector lineal pCR2.1 seguint les instruccions del fabricant generant el vector pCR2.1-RSK4. Llavors, el vector pLPCX-RSK4 es va generar per clonació del fragment de cDNA d'RSK4 del vector pCR2.1-RSK4 fent servir l'enzim de restricció *EcoRI* (Promega Corporation, Madison, WI). El sentit de la clonació del vector

pLPCX-RSK4 es va comprovar per digestió amb l'enzim de restricció *XbaI* (Promega).

pWZL-Blast-RSK4

Per induir la sobreexpressió d'RSK4 a diferents models cel·lulars també es va fer servir el vector retroviral amb resistència a blasticidina pWZL-Blast-RSK4. El vector pWZL-Blast va ser amablement donat pel Dr. A. Carnero (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, CNIO, Madrid, Espanya) i es va fer servir com a control. El vector pWZL-Blast-RSK4 es va generar per clonació del fragment de cDNA d'RSK4 del vector pCR2.1-RSK4 fent servir l'enzim de restricció *EcoRI* (Promega). El sentit de la clonació es va comprovar per digestió amb l'enzim de restricció *NheI* (Promega).

RT-E1A-ER

Aquest vector retroviral induïble va ser amablement cedit pel Dr. A. Serrano (Hospital 12 de Octubre, Madrid, Espanya). Aquest vector conté una proteïna de fusió formada per part del receptor d'estrogen (ER) i la proteïna adenoviral E1A de forma que aquesta proteïna de fusió es localitza en el citoplasma i per tant E1A no realitza la seva funció. L'ús de tamoxifè 1 µM (Calbiochem, Darmstadt, Alemanya) fa que aquesta proteïna es transloqui al nucli, on E1A sí pot realitzar la seva funció (inhibir entre alres proteïnes a RB).

pBabe-KRAS^{V12}

La forma mutada de l'oncogèn *KRAS*, *KRAS*^{V12}, es va sobreexpressar fent servir el vector retroviral amb resitència a puromicina pBabe-KRAS^{V12} amablement cedit pel Dr. A. Carnero. Aquesta forma mutada de *KRAS* consisteix en la substitutició d'una valina per una glicina al codó 12, el que fa que KRAS sigui actiu de forma constitutiva. El vector pBabe es va fer servir com a control.

pMB-BRAF^{E600}

La forma mutada de l'oncogèn *BRAF*, *BRAF*^{E600}, es va sobreexpressar fent servir el vector retroviral pMB-BRAF^{E600} amablement cedit pel Dr. D. Peeper. Aquesta forma mutada *BRAF* consisteix en la substitució d'una valina per un àcid

glutàmic en el codó 600, el que fa que aquesta MAPKKK efectora de RAS sigui activa de forma constitutiva. El vector pMB es va fer servir com a control.

pLKO.1-shRSK4 i pLKO.1-shNT

Per realitzar la inhibició d'RSK4 en les diferents línies cel·lulars es va fer servir la tecnologia dels *short hairpin RNAs* (shRNAs). Es basa en introduir a les cèl·lules un vector que expressa una seqüència de nucleòtids complementaris al mRNA que es vol silenciar. Aquesta seqüència quan es transcriu forma una cadena doble d'RNA que es processada per Drosha i Dicer, de manera que es generen *small interference RNAs* (siRNAs), que formen un complex amb RISC que permet la hibridació amb l'mRNA diana del gen endogen i es degrada produint-se el silenciament del gen en qüestió.

Per seleccionar la seqüència del shRNA de RSK4 (shRSK4) es van provar tres siRNAs validats de RSK4 (AM16708A s945, s946 i s947; Ambion, Austin, TX) seguint les instruccions del fabricant. De tots tres, el siRNA #945 (5' GGUAAAUGGUCUUAAAAUG 3') és el que presentava una major inhibició de RSK4 tant a nivell de RNA com a nivell de proteïna. Fent servir la seqüència del siRNA, es va disenyar la seqüència del shRNA de RSK4 5' GATCCGGTAAATGGTCTTAAAATGTTCAAGAGACATTTTAAGACCATTTACCTT TTTTACGCGTG 3' i es va clonar en el vector pLKO.1 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemanya) generant el vector pLKO.1-shRSK4. El vector pLKO.1-shRNA Non-Target (Sigma-Aldrich) (pLKO.1-shNT d'aquí en endavant) es va fer servir com a control.

pRetroSuper-shp21

Per inhibir l'expressió de p21 es va fer servir el vector retroviral dissenyat per expressar shRNAs: pRetroSuper-shp21, que va ser amablement cedit pel Dr. A. Carnero. El vector pRetroSuper es va fer servir com a control.

4.7 Transfecció de siRNAs

Apart de la transfecció dels siRNAs validats d'*RSK4* (AM16708A; Ambion), també es va transfectar el siRNA validat d'*RB* (s523, Ambion), així com el *Silencer Negative Control siRNA* (AM4611, Ambion) i el *Silencer Cy3-labeled GADPH*

siRNA (AM4623, Ambion) com a control positiu. Per aquestes transfeccions es van plantar 7.5 x 10^4 cèl·lules diana en una placa de 12 pouets. A les 24 h 15 nM de cada siRNA es van transfectar amb lipofectamina 2000 (Invitrogen) segons les instruccions del fabricant. L'eficiència de la transfecció es va comprovar per l'observació en un microscopi de fluorescència del control positiu *Silencer Cy3-labeled GADPH siRNA.* Totes les transfeccions amb siRNAs es van repetir dues vegades obtenint-se resultats similars.

4.8 Generació de retrovirus i infecció

La producció de retrovirus es va realitzar amb la línia de cèl·lules empaquetadores pantròpica GP2 (Clontech). Aquestes cèl·lules deriven de la línia HEK-293 i expressen de forma estable els gens virals que codifiquen per les proteïnes virals Gag i Pol. Per generar retrovirus aquestes cèl·lules s'han de cotransfectar amb el vector d'expressió viral pVSV-G (Clontech) (que conté el gen que codifica per la proteïna viral Env) i el vector d'interès. Es van plantar 1 x 10^6 cèl·lules GP2 per placa de 60 mm i a les 24 h es van cotransfectar amb 2.5 μg del vector retroviral d'interès i 2.5 μg del vector pVSV-G amb JetPei (Genycell Biotech, Granada, Espanya) seguint les instruccions del fabricant. A les 24 h es va recollir el sobrenedant que contenia els retrovirus i es va filtrar (filtre de 0.45 μm, Sarstedt, Nümbrecht, Alemanya). Aquest sobrenedant es va suplementar amb 4 μg/ml de polibrè (Sigma-Aldrich) per facilitar la infecció.

Per realitzar les infeccions es va reemplaçar el medi de cultiu de les cèl·lules diana pel sobrenedant amb els retrovirus. Les cèl·lules diana es van plantar el dia anterior a realitzar la infecció (4.5 x 10^5 cèl·lules HTC116 p53wt; 5.5 x 10^5 cèl·lules HCT116 p53null; 3.5 x 10^5 cèl·lules IMR90; 4.5 x 10^5 cèl·lules MDA-MB-468; 3.5 x 10^5 cèl·lules TIG3 i 3.5 x 10^5 cèl·lules TIG3 p16null per placa de 60 mm). Les cèl·lules productores es van deixar en cultiu i a les 24 h es va tornar a agafar sobrenedant i es va repetir el procediment per realitzar una reinfecció de 24 h més. A les 24 h de la reinfecció les cèl·lules infectades es van seleccionar durant tres dies amb la dosi apropiada de puromicina (Sigma-Aldrich) o de blasticidina (Invivogen, Toulouse, França) (Taula 3). La dosi de selecció dels diferents models

cel·lulars es va triar a partir de la realització de corbes de resistència als antibiòtics (puromicina o blasticidina).

Taula 3. Dosis d'antibiòtics utilitzats per seleccionar cèl·lules infectades.

Línia cel·lular	Puromicina (μg/ml)	Blasticidina (μg/ml)
HCT116 p53wt	0.7	20
HCT116 p53null	0.7	20
IMR90	1.25	
TIG3	0.5	10
TIG3 p16null	0.5	10
MDA-MB-468	0.7	

4.9 Generació de lentivirus

La generació de lentivirus es va realitzar a partir de la línia HEK293T. Es van plantar 5 x 10^6 cèl·lules per placa de 10 cm i es van cotransfectar 8 μg del vector d'interès; 3 μg del vector d'expressió d'Env pMD.G; 3 μg del vector d'expressió de Rev RSV-Rev; i 3 μg del vector d'empaquetament pCMVDR8.2 (tots tres plàsmids cedits del prof. D. Peeper i necessaris per la formació de lentivirus) amb 0.5 ml de HBS (NaCl 280 mM; HEPES 50 mM; Na_2HPO_4 1.5 mM, pH 7.05-7.1) i 0.5 ml de $CaCl_2$ 0,25 M durant 6 h en presència de cloroquina (25 μM; Sigma-Aldrich). Al dia següent es va realitzar una dilució 1:5 del sobrenedant que contenia els lentivirus amb medi de cultiu i es va realitzar la infecció de les cèl·lules diana seguint el mateix protocol que per la infecció retroviral.

4.10 Corbes de creixement

Dos dies després de la selecció, les cèl·lules infectades amb les diferents construccions retrovirals o lentivirals es van comptar i plantar cada 4 dies en plaques de sis pouets. El número de divisions o PD (de l'anglès *population doublings*) es va determinar segons la següent fórmula: PD= Log (N_f/N_i)/Log2, on N_f és el número de cèl·lules comptat i N_i és el número inicial de cèl·lules que es van plantar. El PDL (o *population doubling level*) representa la suma de PDs calculats en passes anteriors. Per la línia cel·lular HCT116 p53wt es van plantar 1.8 x 10^5 cèl·lules; per les línies HCT116 p53null i MDA-MB-468 es van plantar 2.5 x 10^5 cèl·lules. Cada corba es va realitzar al menys dues vegades amb resultats similars i cada punt es va determinar per duplicat.

4.11 Corbes de resistència a cisplatí i peròxid d'hidrogen

Per realitzar les corbes de resistència es van plantar cèl·lules prèviament infectades i seleccionades amb els vectors lentivirals pLKO.1-shRSK4 i pLKO.1-shNT en plaques de 24 pouets (es van plantar 2 x 10^4 cèl·lules de les línies TIG3 i IMR90 i 1.5 x 10^4 cèl·lules per les línies HCT116 p53wt i p53null). Aquestes cèl·lules es van tractar durant 2 h amb concentracions creixents de peròxid d'hidrogen (H_20_2) (de 0 a 400 μM en TIG3 i IMR90; de 0 a 500 μM en HCT116 p53wt i HCT116 p53null) o 3 dies amb concentracions creixents de cisplatí (CDDP) (de 0 a 2,25 μg/ml a TIG3 i IMR90; de 0 a 9 μg/ml en HCT116 p53wt i HCT116 p53null). Després dels tractaments es va afegir medi de cultiu fresc i es van cultivar les cèl·lules 3 dies més. Llavors les cèl·lules es van rentar amb PBS, es van fixar amb formalina al 10% (Sigma) i es van rentar amb aigua destil·lada. Un cop fixades les cèl·lules es van tenyir amb 0.1% de cristall violeta (Sigma) durant 30 minuts i es van rentar amb aigua destil·lada. Un cop assecades, es van destenyir les cèl·lules amb àcid acètic al 10% i es va determinar la seva densitat òptica a 590 nm. El valor del 100% va ser assignat a les cèl·lules sense tractar (concentració 0 de H_20_2 o CDDP). Cada corba es va realitzar tres vegades amb resultats similars i cada punt es va determinar per duplicat.

4.12 Assaig de formació de colònies

Per determinar si les cèl·lules infectades amb les diferents construccions podien proliferar o no, dos dies després de la selecció es van plantar en plaques de sis pouets o en plaques de 60 mm a baixa densitat (Taula 4) i es van mantenir en cultiu un mínim de 10 dies fins que els controls van arribar a confluència. En aquest moment les cèl·lules es van rentar amb PBS, es van fixar amb formalina al 10% (Sigma) i es van rentar amb aigua destil·lada. Un cop fixades les cèl·lules es van tenyir amb 0.1% de cristall violeta (Sigma) durant 30 minuts, es van rentar amb aigua destil·lada i es van deixar assecar. La tinció amb cristall violeta permet l'observació directa de les colònies formades. Cada expreriment es va realitzar com a mínim dues vegades amb resultats similars.

Taula 4. Número de cèl·lules plantades per realitzar l'assaig de formació de colònies

Línia cel·lular	Placa de sis pous	Placa de 60 mm
HCT116 p53wt	5×10^4	$1{,}25 \times 10^5$
HCT116 p53null	5×10^4	$1{,}25 \times 10^5$
TIG3	8×10^4	$1{,}8 \times 10^5$
TIG3 p16null	$7{,}5 \times 10^4$	$1{,}7 \times 10^5$

4.13 Tractaments cel·lulars amb SB203580 i N-Acetilcisteïna

Per inhibir la via de p38MAPKs, la línia cel·lular TIG3 infectada amb els vectors pLPCX-GFP i pLPCX-RSK4 es va tractar amb l'inhibidor de p38MAPK SB203580 (Calbiochem) [90]. Per inhibir la formació d'espècies reactives d'oxigen les cèl·lules es van tractar amb l'agent antioxidant N-Acetilcisteïna (NAC) (Sigma) [91]. Un dia després de la selecció, 7.5×10^4 cèl·lules es van sembrar en plaques de sis pouets i es van tractar cada 24 h amb DMSO (Control), amb 8 μM de SB203580 o amb 1 nM de NAC durant 14 dies. Cada expreriment es va realitzar com a mínim dues vegades amb resultats similars.

4.14 Inducció de senescència

Per induir senescència replicativa la línia de fibroblasts humans IMR90 es va mantenir en cultiu de forma contínua fins a passe 40.

Per induir senescència per estrès es van tractar les línies cel·lulars HCT116 p53wt i p53null amb H_20_2 a 500 µM durant 2 h i amb 2 µg/mL de CDDP durant 6 h. Després dels tractaments les cèl·lules es van mantenir en cultiu amb medi fresc durant 3 dies.

4.15 Activitat SA-β-Galactosidasa

L'activitat SA-β-gal es va determinar fent servir el kit *Senescence β-galactosidase kit* (Cell Signaling, Beverly, MA), seguint les instruccions del fabricant. Cada experiment es va realitzar com a mínim dues vegades.

4.16 Determinació de SAHF

Un cop determinada l'activitat SA-β-gal, les cèl·lules es van rentar amb PBS i es van incubar durant 5 minuts amb una solució de DAPI 300 nM en PBS. Després de la incubació les cèl·lules es van rentar amb PBS i la determinació de SAHF es va realitzar per observació de les cèl·lules en un microscopi de fluorescència.

4.17 Extracció de proteïnes i *Western blot*

Les cèl·lules es van rentar en PBS fred i es van lisar amb Tampó de Lisi (HEPES 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, 1% de Triton X, EDTA 1 mM i 10% de glicerol) en presència d'inhibidors de proteases (aprotinina 1 µg/ml, leupeptina 1 µg/ml i DTT 1 mM) i d'inhibidors de fosfatases (NaF 20 mM, NaPPi 0.1 M, Na_3VO_4 2 mM, PMSF en etanol 1 mM i β-Glicerofosfat 20 mM) durant 30 min a 4ºC. Després les cèl·lules es van recollir en un eppendorf i es van centrifugar a 15000 g durant 10 min a 4ºC. Per altra banda, l'extracció de proteïnes dels teixits es va realitzar a partir dels teixits pulveritzats (amb nitrogen líquid i un morter) amb el

mateix tampó de lisi, però les mostres es van sonicar durant 10 s abans de la centrifugació. Tant per les cèl·lules com pels teixits, es va recollir el sobrenedant i es va quantificar amb el reactiu *Bio-Rad Protein Assay* (BioRad, Munich, Alemanya) segons les instruccions del fabricant. A 25-100 μg de proteïnes se'ls hi va posar Tampó de Càrrega (Tampó Laemmli 1x: Tris HCl 0.0626 M pH 6.8, 2% d'SDS, 0.01% de blau de bromofenol i10% de glicerol) i es van desnaturalitzar durant 5 min a 95ºC.

Les proteïnes es van carregar en gels de poliacrilamida de diferents percentatges (8-12%) en funció del pes molecular de la proteïna que es volia analitzar, i es va realitzar l'electroforesi en gel de poliacrilamida amb dodecilsulfat de sodi (SDS-PAGE). Un cop separades les proteïnes per pes molecular es transferien a una membrana de PVDF, aplicant un amperatge constant de 400 mA durant 1h i 15 min.

Un cop finalitzada la transferència les membranes es van bloquejar amb 5% de llet desnatada en T-TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM i 0.1% de Tween-20) durant 1 h. Després del bloqueig es van incubar amb l'anticòs primari diluït en 5% de llet desnatada en T-TBS (o en 5% de BSA en T-TBS en el cas dels fosfoanticossos) durant tota la nit en moviment a 4ºC (Taula 5). Posteriorment es van realitzar tres rentats de 10 min amb 5% de llet desnatada en T-TBS i es va incubar durant 1 h l'anticòs secundari diluït en 5% de llet en T-TBS a temperatura ambient. Finalment es van realitzar tres rentats de 10 min en 5% de llet en T-TBS i es va revelar utilitzant el sistema d'emissió de quimioluminiscència ECL (Amersham Pharma-Biotech, Dreieich, Alemanya).

La intensitat de les bandes obtingudes per *Western blot* es van quantificar per densitometria amb el software ImageJ (versió 1.41o, National Institutes of Health, Bethesda, MD). En tots els casos es va normalitzar l'expressió de la proteïna d'interès amb la intensitat de la banda de β-Actina i es va expressar en unitats densitomètriques arbitràries (UDA). Cada *Western blot* es va realitzar com a mínim per duplicat.

Taula 5. Anticossos utilitzats per *Western blot*

Anticòs	Referència i casa comercial	Dilució
Primaris		
anti-Actina	CP01; Calbiochem	1:7000
anti-RSK4	sc-17178; Santa Cruz, Santa Cruz, CA	1:100
anti-p21WAF1	MS-891; Neomarkers, Fremont, CA	1:500
anti-p53 clon DO-7	M7001; Dako, Glostrup, Dinamarca	1:500
anti-RB	G3-245, BD Biosciences, San Jose, CA	1:200
anti-p16	DB018, Deltabiolabs, Gilroy, CA	1:200
anti-BRAF	sc-5284; Santa Cruz	1:500
anti-KRAS	sc-30; Santa Cruz	1:200
Secundaris		
Donkey Anti-goat IgG-HRP	sc-2020; Santa Cruz	1:5000
Sheep Anti-Mouse IgG-HRP	NA9310; Amersham Pharma-Biotech	1:3000
Donkey Anti-Rabbit IgG-HRP	NA9340; Amersham Pharma-Biotech	1:2000

RESULTATS

5.1 Expressió d'RSK4 a tumors humans

Fins al moment és molt poc el que es coneix del gen *RSK4,* però els estudis realitzats fins ara semblen indicar que podria ser un gen supressor de tumors ja que s'ha relacionat amb el control del cicle cel·lular [8], la inhibició de la via de RAS-MAPKs [86] i molt recentment amb el control de la metàstasi [88]. Els gens supressors tumorals es troben generalment poc expressats en tumors. Per això es va voler avaluar els nivells d'expressió d'*RSK4* a diferents tumors humans.

En un estudi previ del nostre grup de recerca es van analitzar 15 mostres de carcinoma de còlon i es va observar per RT-PCR a temps real que els carcinomes expressen menys RSK4 que el teixit normal [65]. En el present estudi es van analitzar de nou aquestes 15 mostres junt amb 15 mostres més de carcinoma de còlon. A més a més, en aquest estudi es va analitzar l'expressió d'*RSK4* en 20 mostres de carcinoma renal, ja que el ronyó és en un dels teixits on s´ha descrit expressió d'RSK4 [69, 87]. Degut a la gran heterogeneïtat que hi pot haver en els nivells d'expressió dels gens entre diferents individus, el nivell d'expressió d'*RSK4* a cada carcinoma es va comparar amb el seu nivell d'expressió al teixit sa adjacent al tumor. Totes les mostres van ser analitzades al Departament d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron, on es va realitzar el corresponent diagnòstic. Un cop realitzada l'extracció de l'RNA total i la síntesi del cDNA, es va realitzar la RT-PCR a temps real.

Per poder normalitzar els resultats de l'expressió d'*RSK4* entre les mostres normals i les tumorals es va realitzar un estudi previ per triar el millor gen de referència a cada tipus de teixit (còlon i ronyó). Un gen de referència és un gen que té els mateixos nivells d'expressió entre les mostres a analitzar (en aquest cas entre carcinoma de còlon o carcinoma renal i teixit sa). Per realitzar aquest estudi es va comparar l'expressió de 16 gens de referència entre vuit mostres de còlon (quatre mostres de carcinoma i quatre mostres de teixit sa adjacent als tumors) i vuit mostres de ronyó (quatre mostres de carcinoma i quatre mostres de teixit sa adjacent als tumors). Després de l'extracció de l'RNA i la síntesi del cDNA es va realitzar una RT-PCR a temps real i es van analitzar els resultats. Es va calcular la desviació estàndard de l'expressió dels 16 gens de referència entre les vuit mostres de cada teixit i es va obtenir que el gen *POLR2* (RNA polimerasa II) era el que mantenia una expressió més estable (menor desviació estàndard) entre totes

les mostres de còlon (normals i tumorals), mentre que el gen *PPIA* (ciclofilina A) ho era pel teixit de ronyó (Taula 4). Tot i que en el cas de les mostres de còlon el gen *18S* presentava una menor desviació estàndard no es va considerar un bon gen de referència ja que s´ha observat que al tractar-se d'rRNA té una taxa de degradació molt diferent a la dels mRNAs [92].

Taula 4. Anàlisi de gens de referència. Desviació estàndard dels nivells d'expressió de 16 gens de referència analitzats en vuit mostres de còlon i vuit mostres de ronyó. Cada mostra es va analitzar per triplicat.

Gen endogen	Mostres còlon	Mostres ronyó
18S	0.91	3.02
ACT	1.90	2.24
B2M	1.72	2.12
GAPDH	2.05	2.95
GUSB	1.65	1.80
HMBS	1.74	1.62
HPRT1	2.27	1.27
IPO8	1.65	1.73
PGK1	1.99	2.49
POLR2	**1.20**	1.53
PPIA	1.95	**1.17**
RPLPO	2.19	1.63
TBP	2.42	1.51
TFRC	2.04	2.04
UBC	1.85	1.62
YWHAZ	2.06	1.56

Per fer l'anàlisi de l'expressió d'*RSK4*, totes les mostres van ser analitzades per triplicat fent servir el mètode *RQ Study.* Es va triar aquest tipus d'estudi ja que tant el gen problema (*RSK4*) com els gens de referència (*POLR2* i *PPIA*) mantenien la mateixa eficiència d'amplificació a diferents rangs de concentració, el que ens permetia treballar sense realitzar la corba estàndard (*Abi Prism 7000 RQ Plate and RQ Study, User Guide*) (Figura 8).

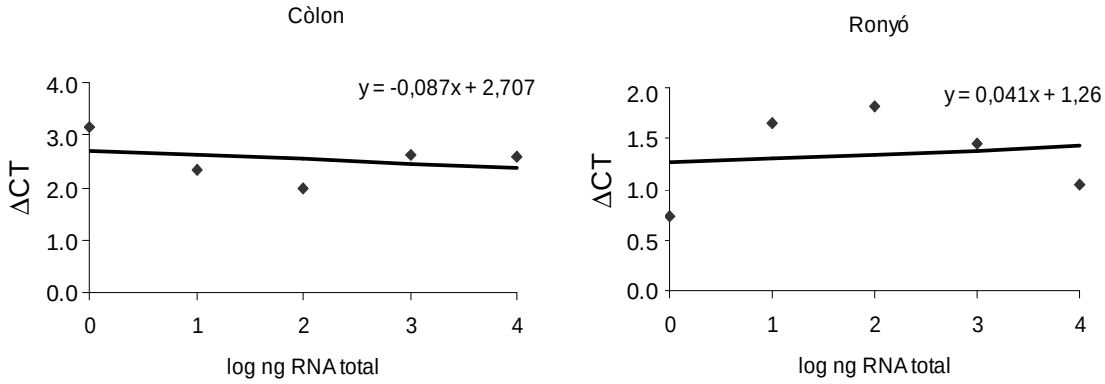


Figura 8. Eficiència d'amplificació entre RSK4 i els gens de referència.
Gràfics del logaritme de la concentració de RNA total *versus* la diferència de C_T entre el gen diana *RSK4* i el gen de referència *POLR2* per còlon i *PPIA* per ronyó. Un pendent de la recta inferior a 0.1 indica que a diferents rangs de concentració els dos gens analitzats tenen una eficiència d'amplificació igual.

Un cop triats els gens de referència i el mètode d'anàlisi, es va analitzar l'expressió d'*RSK4* a diferents tumors humans. Els resultats obtinguts en carcinoma de còlon van demostrar que *RSK4* es trobava menys expressat en el teixit tumoral que en el teixit normal en 27 de les 30 mostres analitzades (90%). En el cas de carcinoma de ronyó, també s'observava que *RSK4* s'expressava menys en el teixit tumoral que en el teixit normal en 16 de les 20 mostres analitzades (80%). Per determinar si aquestes diferències eren significatives es van analitzar els resultats amb el test estadístic no paramètric de Wilcoxon on es van obtenir unes diferències significatives tant per les mostres de còlon ($p<0.001$) com per les mostres de ronyó ($p<0.01$), amb una mitjana de reducció de l'mRNA d'*RSK4* de cinc vegades en carcinomes de còlon i 10 vegades en carcinomes renals respecte al teixit sa (Figura 9 A). D'aquelles mostres de carcinoma de còlon i carcinoma renal de les que es disposava de més teixit congelat es va realitzar una extracció proteica i es va analitzar l'expressió d'*RSK4* per *Western blot*; aquests resultats confirmaven la pèrdua d'expressió d'*RSK4* tant a nivell d'RNA com de proteïna (Figura 9 B).

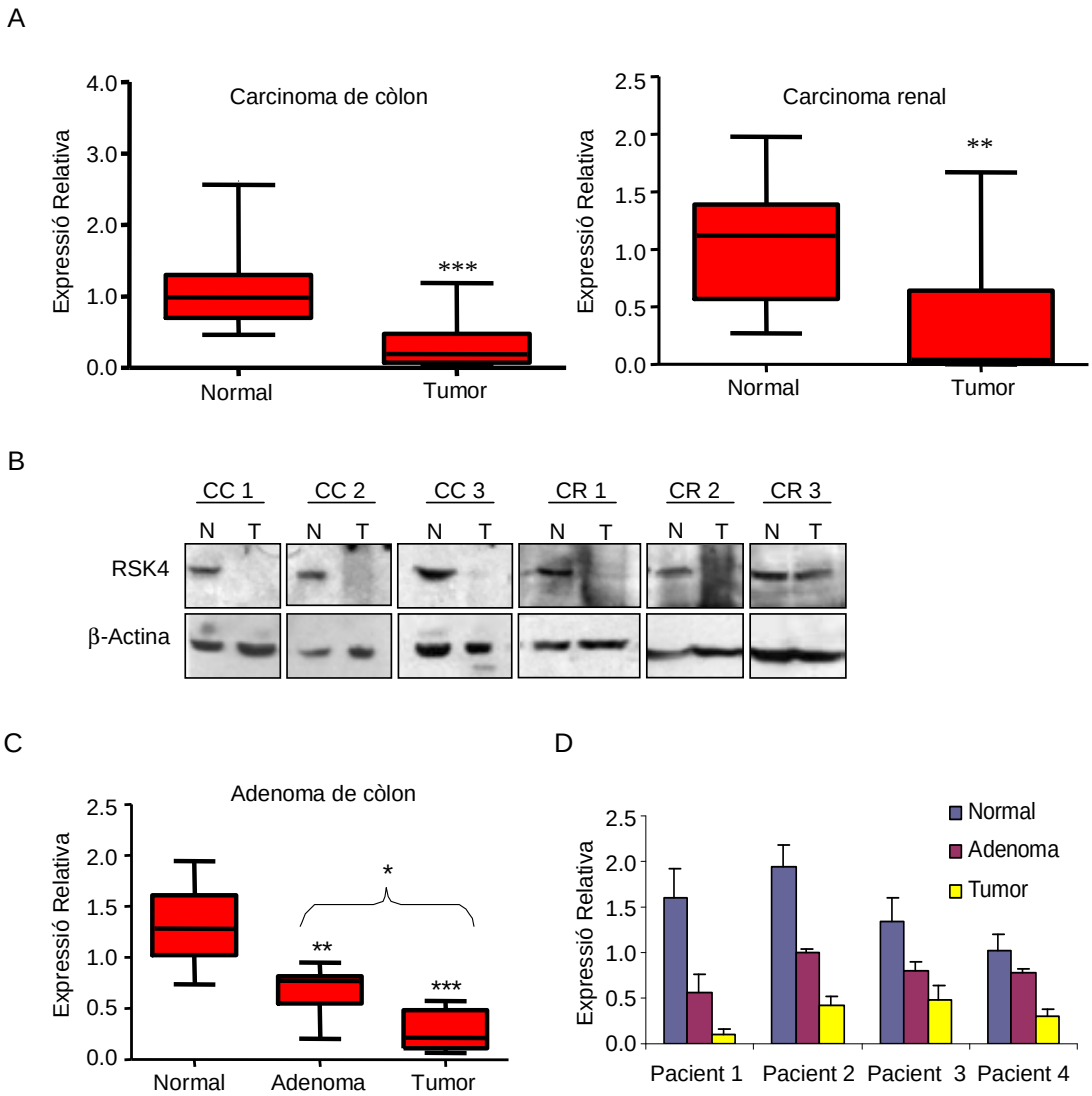


Figura 9. L'expressió d'*RSK4* és més baixa en adenomes i carcinomes que en teixit normal

A. Es van analitzar els nivells d'expressió de l'mRNA d'*RSK4* en 30 carcinomes de còlon i 20 carcinomes renals per RT-PCR a temps real i es van comparar amb els nivells d'expressió en el teixit normal. **B**. L'expressió d'RSK4 a nivell de proteïna va ser analitzada per *Western blot* en tres pacients amb carcinoma de còlon i tres pacients amb carcinoma renal. **C**. Es va comparar l'expressió de l'mRNA d'*RSK4* per RT-PCR a temps real entre set adenomes de còlon, set mostres de teixit normal i set mostres de carcinoma de còlon. **D**. Es van analitzar els nivells d'expressió de l'mRNA d'*RSK4* per RT-PCR a temps real durant la progressió tumoral en teixit normal, adenoma i carcinoma de còlon provinents del mateix pacient. Les barres d'error representen la desviació estàndard entre triplicats.

Les figures A i C són diagrames de caixes. El nivell de significació es va avaluar amb el text estadístic de Wilcoxon i es representa com (*) $P<0.05$, (**) $P<0.01$, i (***) $P<0.001$. El significat de les abreviacions és N, teixit normal; T, teixit tumoral; CC, carcinoma de còlon; CR, carcinoma renal.

De forma molt simplificada es pot dir que la formació dels carcinomes de còlon segueix la següent seqüència bàsica: hiperplàsia (augment del creixement cel·lular), adenoma (tumor benigne) i carcinoma (tumor amb capacitat invasiva). Per veure en quin moment d'aquesta progressió tumoral es produeix la inhibició de l'expressió d'*RSK4* es van triar a l'atzar set mostres de teixit normal de còlon, set mostres d'adenoma i set mostres de carcinoma de còlon i es va analitzar l'expressió d'*RSK4* per RT-PCR a temps real. Es va observar que ja en adenomes existia una disminució significativa en l'expressió d'*RSK4* en referència a les mostres normals ($p<0.01$) però aquesta expressió d'*RSK4* en adenomes era més elevada que en carcinomes ($p<0.05$) (Figura 9 C). Finalment es va analitzar l'expressió d'*RSK4* en mostres procedents de quatre pacients dels que es disposava tant de mostra de teixit normal com de mostra d'adenoma i de carcinoma del mateix pacient. En els quatre casos s'observà una tendència a la pèrdua progressiva de l'expressió d'*RSK4* com més avançat era l'estadiatge de la mostra (Figura 9 D).

5.2 Funció d'RSK4

5.2.1 La sobreexpressió d'RSK4 en línies cel·lulars de carcinoma de còlon indueix l'aturada de la proliferació cel·lular

Una de les estratègies utilitzades per estudiar la funció d'una proteïna és analitzar els efectes de la seva sobreexpressió. Per obtenir una primera aproximació de la funció d'RSK4 es va triar un model de línia cel·lular de carcinoma de còlon on no s'expressés *RSK4* per determinar com afectava la seva sobreexpressió a marcadors de cicle cel·lular i senescència, ja que Berns *et al.* [8] van descriure que la inhibició d'*RSK4* evitava la parada del cicle cel·lular dependent de p53. A més a més, també es va induir la sobreexpressió d'RSK4 a un model de carcinoma de còlon sense expressió de p53 per determinar si la funció d'RSK4 és dependent o no d'aquesta proteïna.

Inicialment es va analitzar l'expressió endògena d'*RSK4* per RT-PCR a temps real en les línies de carcinoma de còlon HCT116 p53wt i HCT116 p53null i es va comparar amb els nivells d'expressió de la línia de cèl·lules embrionàries de

ronyó HEK293T (control positiu d'expressió d'RSK4) [69] i de la línia de fibroblasts humans diploides IMR90 (control de cèl·lules normals). Es va observar que al igual que succeïa en carcinomes de còlon humans, l'expressió d'*RSK4* a les línies de carcinoma era molt més baixa que a la línia de cèl·lules normals IMR90 i a la línia HEK293T (Figura 10). Per normalitzar els resultats es va fer servir el gen de referència *POLR2A*.

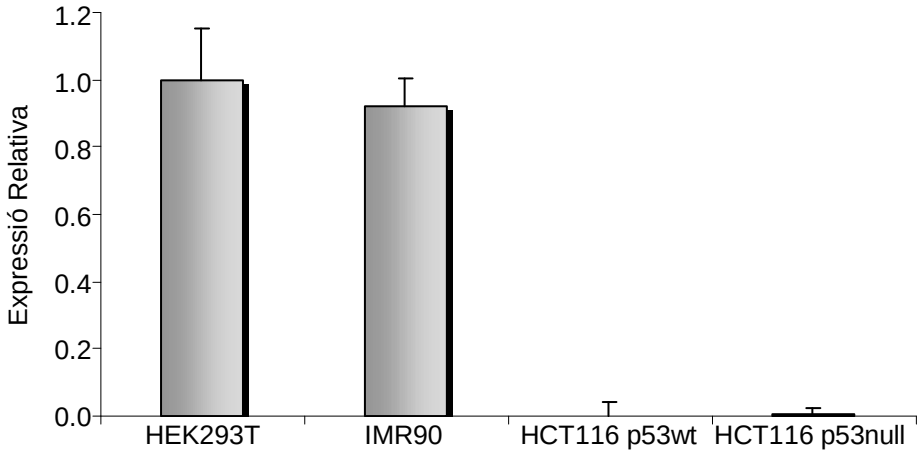


Figura 10. Anàlisi de l'expressió d'*RSK4* a diferents línies cel·lulars
L'expressió d'*RSK4* es va analitzar a les línies cel·lulars HEK293T, IMR90, HCT116 p53wt i HCT116 p53null per RT-PCR a temps real. Les barres d'error representen la desviació estàndard entre triplicats.

Per obtenir una major eficiència en la transducció d'*RSK4* i una expressió estable es van utilitzar els vectors retrovirals pLPCX-GFP (vector control) i pLPCX-RSK4. Després de la infecció les cèl·lules es van seleccionar i 2 dies després de la selecció es van realitzar corbes de creixement per cada un dels tipus cel·lulars. Es va observar que les cèl·lules que expressaven RSK4 deixaven de proliferar i no s'acumulaven en cultiu mentre que les cèl·lules que expressaven GFP proliferaven normalment (Figura 11 A). Per comprovar si aquesta disminució de la proliferació era deguda a que les cèl·lules entraven en senescència o bé si era deguda a algun altre mecanisme (com per exemple apoptosi), 2 dies després de la selecció es van plantar les cèl·lules a baixa densitat en plaques de sis pouets i 4 dies després es va determinar l'activitat SA-β–gal. S'observà que les cèl·lules amb expressió d'RSK4 eren positives pel marcador de senescència SA-β-gal i a més a més,

mostraven grans canvis morfològics (eren molt més grans i vacuolitzades) (Figura 11 B). Aquest fenotip era independent de p53 ja que s'observava tant en les HCT116 p53wt com en les p53null.

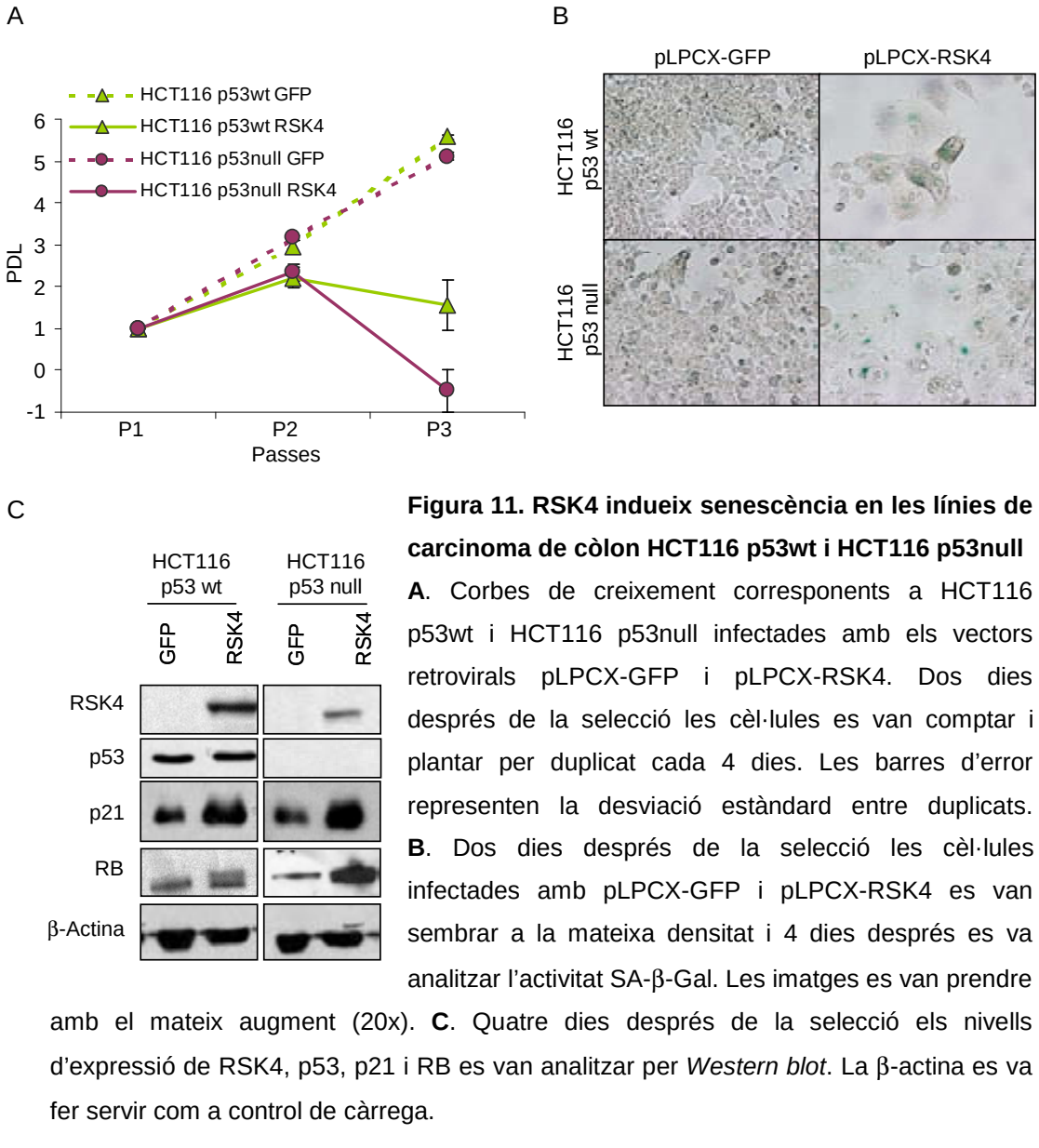


Figura 11. RSK4 indueix senescència en les línies de carcinoma de còlon HCT116 p53wt i HCT116 p53null **A**. Corbes de creixement corresponents a HCT116 p53wt i HCT116 p53null infectades amb els vectors retrovirals pLPCX-GFP i pLPCX-RSK4. Dos dies després de la selecció les cèl·lules es van comptar i plantar per duplicat cada 4 dies. Les barres d'error representen la desviació estàndard entre duplicats. **B**. Dos dies després de la selecció les cèl·lules infectades amb pLPCX-GFP i pLPCX-RSK4 es van sembrar a la mateixa densitat i 4 dies després es va analitzar l'activitat SA-β-Gal. Les imatges es van prendre amb el mateix augment (20x). **C**. Quatre dies després de la selecció els nivells d'expressió de RSK4, p53, p21 i RB es van analitzar per *Western blot*. La β-actina es va fer servir com a control de càrrega.

Per comprovar si l'expressió d'RSK4 afectava a alguna de les dues grans vies de regulació de senescència (p16/RB o p53), 4 dies després de finalitzar la selecció es va analitzar l'expressió de les proteïnes p53, p21 i RB, així com d'RSK4 per comprovar la seva sobreexpressió (Figura 11 C). En totes dues línies cel·lulars, les cèl·lules que expressaven RSK4 presentaven major expressió de p21 que les cèl·lules control. Tot i que p21 és regulat principalment per p53, en aquest

cas l'increment era independent de p53 ja que s'observava també en la línia HCT116 p53null. També es va observar en la línia HCT116 p53wt que RSK4 no afectava l'expressió de p53. A més a més, tots dos tipus cel·lulars presentaven un increment en la forma hipofosforilada d'RB. L'expressió de p16 no es va analitzar en aquests models cel·lulars ja que presenten mutacions en aquest gen [93].

5.2.2 La sobreexpressió d'RSK4 en la línia de fibroblasts IMR90 indueix l'aturada de la proliferació cel·lular

Per determinar si RSK4 està realment implicat en la regulació de la senescència, es va analitzar l'efecte de la seva sobreexpressió a la línia cel·lular primària IMR90. Es va triar aquest model cel·lular ja que aquesta línia deriva de fibroblasts humans diploides no transformats (o HDF, de l'anglès *Human diploid fibroblasts*), fet que fa que aquest model cel·lular sigui un dels més utilitzats per realitzar estudis de senescència tant replicativa com induïda per estrès.

Per determinar l'efecte de la sobreexpressió d'RSK4 en aquest model cel·lular, les cèl·lules es van infectar amb els vectors retrovirals pLPCX-GFP i pLPCX-RSK4 i 2 dies després de la selecció les cèl·lules es van comptar i sembrar a la mateixa densitat en plaques de sis pouets. Quatre dies després es va observar que les cèl·lules que expressaven RSK4 presentaven un fenotip diferent a les cèl·lules amb expressió de GFP; eren molt més grosses i allargades, fenotip corresponent amb IMR90 senescents [32]. Per comprovar aquest fenotip es va determinar l'activitat SA-β-gal així com l'aparició de SAHF detectats per tinció amb DAPI i es va observar que les cèl·lules amb expressió d'RSK4 eren positives per aquests dos marcadors de senescència (Figura 12 A).

Per veure si RSK4 afectava a les vies de regulació de senescència, 4 dies després de la selecció es va realitzar l'extracció proteica i es va analitzar per *Western blot* l'expressió de les proteïnes p53, p21 i p16, observant-se increment en l'expressió de p21 i p16, mentre que no hi havia diferències en p53. També es va comprovar l'expressió d'RSK4 (Figura 12 B).

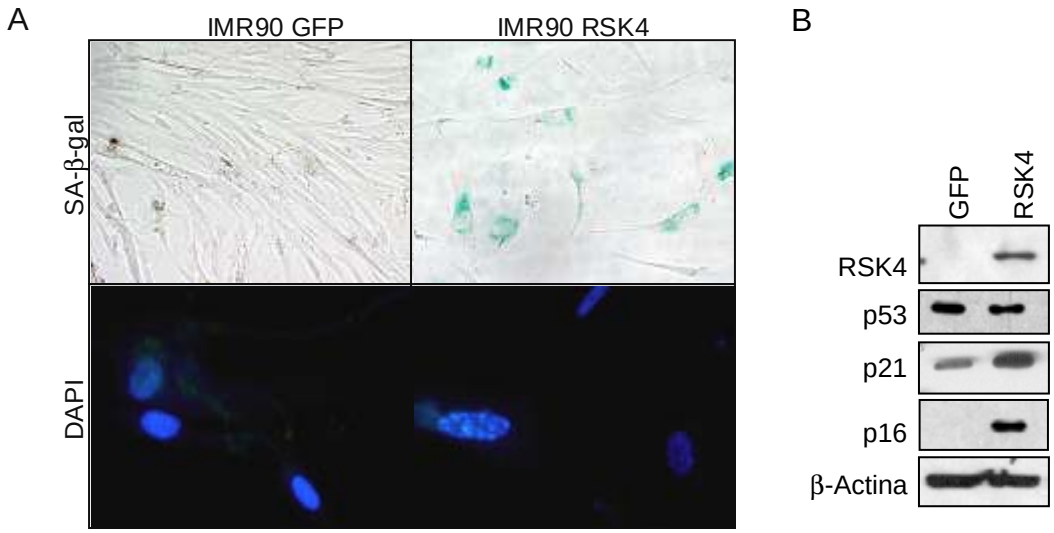


Figura 12. RSK4 indueix senescència en la línia cel·lular IMR90

A. La línia cel·lular IMR90 es va infectar amb els vectors retrovirals pLPCX-GFP i pLPCX-RSK4. Dos dies després de la selecció les cèl·lules es van sembrar a la mateixa densitat i 4 dies després es va analitzar l'activitat SA-β-Gal (augment 20x) i la formació de SAHF amb tinció DAPI (augment 40x). **B**. Quatre dies després de la selecció els nivells d'expressió d'RSK4, p53, p21 i p16 es van analitzar per *Western blot*. La β-actina es va fer servir com a control de càrrega.

5.2.3 RSK4 indueix senescència en un nou model d'HDFs

L'ús de fibroblasts per realitzar estudis de senescència comporta una sèrie d'inconvenients, com per exemple que tenen una vida mitjana de 40-50 passes, el que limita el seu ús. A més a més, la seva taxa de replicació és baixa, el que disminueix l'eficiència de transducció de les infeccions retrovirals.

Per separar els efectes de la senescència induïda per RSK4 dels deguts a l'envelliment dels fibroblasts pels successius passes en cultius i per realitzar nous experiments per intentar aclarir la relació d'RSK4 amb la senescència, es va decidir treballar amb un nou model d'HDFs amb expressió ectòpica d'hTERT i expressió del receptor ecotròpic. Aquest nou model d'HDFs són els fibroblasts TIG3 i la línia derivada que no expressa p16, TIG3 p16null.

L'expressió d'hTERT en línies d'HDFs té la capacitat d'immortalitzar les cèl·lules degut a que no es produeix un escurçament tan ràpid dels telòmers. Aquestes cèl·lules, però, continuen sent sensibles als estímuls que indueixen senescència de forma independent als telòmers [6, 30, 31].

El primer experiment amb aquestes noves línies va ser comprovar quin era l'efecte de la sobreexpressió d'RSK4. De la mateixa manera que succeïa amb la línia IMR90, RSK4 induïa una parada de la proliferació i un increment de l'activitat SA-β-gal, demostrant que l'expressió d'hTERT no afecta a la senescència induïda per RSK4 i que aquesta era independent de p16 ja que també s'observava a la línia TIG3 p16null. En aquest cas, la sobreexpressió d'RSK4 només incrementava l'expressió de p21 i no pas la de p16 en el model cel·lular TIG3 (Figura 13 B).

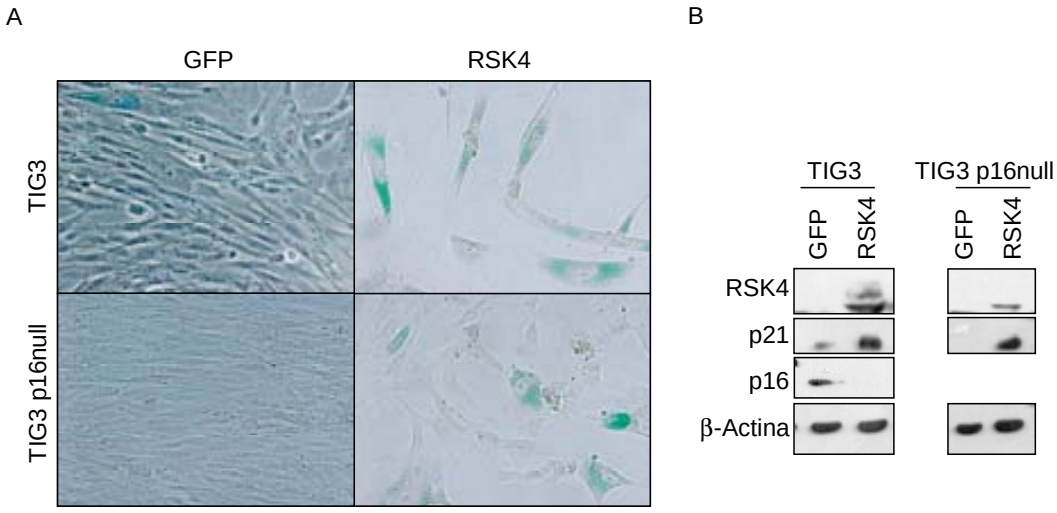


Figura 13. RSK4 indueix senescència a TIG3 i TIG3 p16null

A. Dos dies després de la selecció, les cèl·lules infectades amb pLPCX-GFP i pLPCX-RSK4 es van sembrar a la mateixa densitat i 4 dies després es va analitzar l'activitat SA-β-gal. **B**. Quatre dies després de la selecció els nivells d'expressió d'RSK4, p21 i p16 es van analitzar per *Western blot*. La β-actina es va fer servir com a control de càrrega.

5.3 Regulació d'RSK4 en senescència

5.3.1 L'expressió d'RSK4 incrementa en cèl·lules senescents

Un cop determinat que la sobreexpressió d'RSK4 induïa un fenotip característic de senescència tant en cèl·lules normals com en cèl·lules de carcinoma, es va voler determinar si els nivells d'*RSK4* endogen es veuen afectats en cèl·lules senescents.

Per assolir aquest objectiu es va induir senescència replicativa a la línia de fibroblasts IMR90. Aquesta línia cel·lular no expressa telomerasa i no està immortalitzada, fet que fa que tingui una vida mitjana en cultiu d'aproximadament 40-50 passes. Per aconseguir que aquesta línia desenvolupés senescència replicativa es va descongelar un vial d'IMR90 de passe 12 i es va mantenir en cultiu fins a passe 40, moment en el qual les cèl·lules van adquirir una morfologia típicament senescent i es va determinar l'activitat SA-β-gal (Figura 14 A). Un cop comprovat que aquestes cèl·lules es trobaven en senescència, es va realitzar l'extracció de l'mRNA total i de proteïna i es va comparar l'expressió d'RSK4 amb unes IMR90 de passe 15 (control) que es trobaven en fase de creixement. Tant a nivell d'mRNA com a nivell de proteïna es va observar un increment en l'expressió d'RSK4 de 1.8 i de 2.1 vegades, respectivament (Figura 14 B i C).

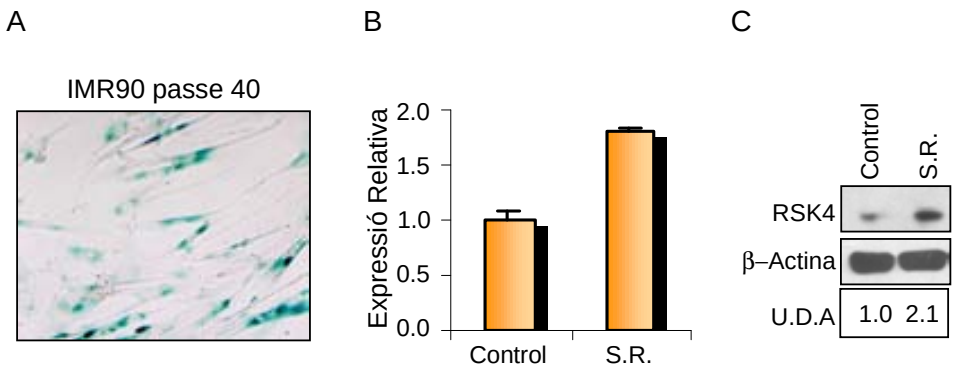


Figura 14. Increment de l'expressió d'RSK4 en senescència replicativa

A. Activitat SA-β-gal en IMR90 en passe 40. **B.** Anàlisi de l'expressió d'*RSK4* per RT-PCR a temps real a cèl·lules IMR90 control (en passe 15) i a IMR90 en senescència replicativa o S.R. (en passe 40). L'expressió d'*RSK4* es va normalitzar amb el gen de referència *POLR2*. **C**. Anàlisi de l'expressió d'RSK4 a nivell de proteïna per *Western blot*. La intensitat de les bandes es va quantificar per densitometria fent servir el software ImageJ i normalitzant amb β-actina.

S'ha descrit que algunes cèl·lules tumorals tenen la capacitat d'activar la resposta que indueix senescència quan són sotmeses a certs estímuls, com pot ser la reexpressió de gens supressors tumorals o l'acció de quimioteràpics [4, 56]. En el cas de la línia de carcinoma de còlon HCT116 s'ha descrit que tractaments

subcitotòxics d'H_2O_2 i CDDP poden induir senescència per generació de ROS i de dany en el DNA, respectivament [94].

En el present estudi es van plantar les cèl·lules HCT116 p53wt i HCT116 p53null en plaques de sis pouets i es van tractar amb 500 μM d'H_2O_2 durant 2 h o amb 2 μg/ml de CDDP durant 6 h. Després es van mantenir en cultiu amb medi fresc durant 3 dies i es va comprovar l'activitat SA-β-gal (Figura 15 A). Un cop comprovat que aquest tractament induïa senescència es va analitzar l'expressió d'*RSK4* per RT-PCR a temps real a les 24, 48 i 72 hores després d'aturar el tractament amb H_2O_2 i es va observar que tant a HCT116 p53wt com a HCT116 p53null es produïa un pic en l'expressió d'*RSK4* 48 hores després del tractament (Figura 15 B). A més a més, tant el tractament amb H_2O_2 com el tractament amb CDDP induïa a les 48 hores un increment en l'expressió de l'mRNA d'*RSK4* de 6 i 5 vegades, respectivament, en HCT116 p53wt i de 4 i 6 vegades en HCT116 p53null. Aquest resultats indiquen que l'expressió d'*RSK4* incrementa quan les cèl·lules reben un estímul inductor de senescència per estrès i que aquest increment d'expressió d'*RSK4* es pot produir en cèl·lules que no expressen p53 (Figura 15 C).

5.4 Efecte *in vitro* de la inhibició d'RSK4

5.4.1 Generació de línies cel·lulars sense expressió d'RSK4

Després de comprovar que la sobreexpressió d'RSK4 indueix un fenotip característic de senescència a diferents tipus cel·lulars, i vist que la seva expressió sembla incrementar en situacions que indueixen senescència, vam voler comprovar quin efecte causava la inhibició d'RSK4 a les línies cel·lulars IMR90, TIG3, TIG3 p16null, HCT116 p53wt i HCT116 p53null mitjançant shRNA.

La seqüència d'shRNA d'*RSK4* es va clonar en el vector lentiviral pLKO.1 generant el vector pLKO.1-shRSK4; com a control es va fer servir el vector pLKO.1-shNT (vector control amb una seqüència d'shRNA que no hibrida amb cap seqüència coneguda). Tots els tipus cel·lulars es van infectar amb aquests vectors i els experiments es van realitzar un cop finalitzat el període de selecció i un cop comprovada la inhibició d'*RSK4* per RT-PCR a temps real.

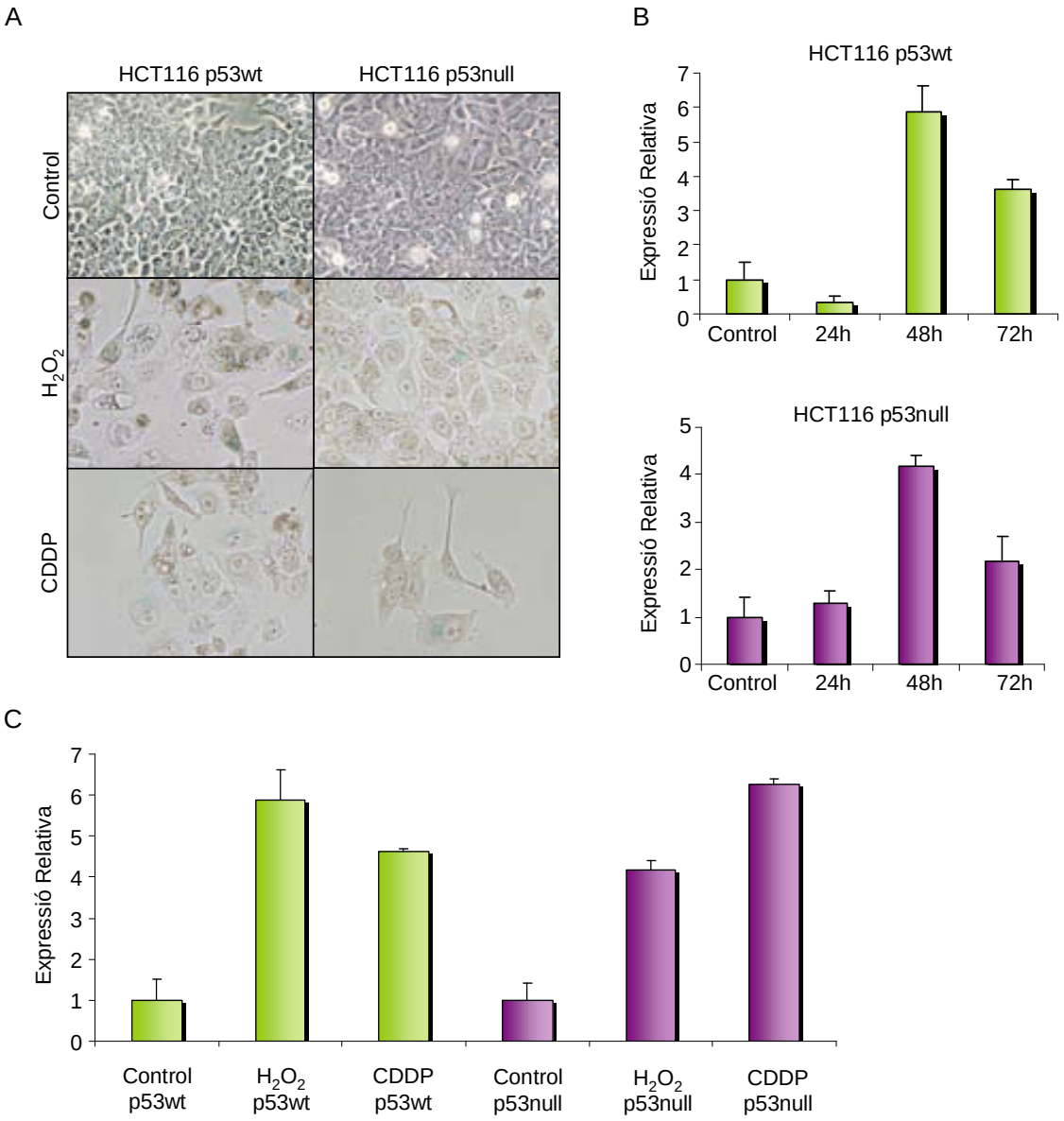


Figura 15. Increment de l'expressió d'RSK4 en línies de carcinoma de còlon senescents

A. Les línies cel·lulars HCT116 p53wt i HCT116 p53null es van tractar amb 500 μM d'H_2O_2 durant 2 h o amb 2 μg/ml de CDDP durant 6 h. Després es van mantenir amb medi fresc en cultiu durant 3 dies i es va analitzar l'activitat SA-β-gal. **B.** Les línies cel·lulars HCT116 p53wt i HCT116 p53null es van plantar a la mateixa densitat i es van tractar 2 h amb 500 μM d'H_2O_2. Després es van mantenir en cultiu amb medi fresc i l'expressió de *RSK4* es va analitzar per RT-PCR a temps real a les 24, 48 i 72 hores després de finalitzar el tractament. **C**. L'expressió d'*RSK4* es va analitzar per RT-PCR a temps real 48 h després de tractar les línies cel·lulars HCT116 p53wt o HCT116 p53null amb 500 μM d'H_2O_2 durant 2 h o amb 2 μg/ml de CDDP durant 6 h. Es van fer servir com a control cèl·lules sense tractar. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard entre triplicats.

5.4.2 La inhibició d'RSK4 retarda la senescència replicativa

En el model cel·lular IMR90 s'havia observat prèviament que les cèl·lules senescents expressaven més RSK4 que les cèl·lules pre-senescents. Per aquest motiu es va voler comprovar si la inhibició d'*RSK4* feia incrementar la vida mitjana d'aquestes cèl·lules en cultiu. Per dur a terme aquest objectiu es va realitzar la infecció dels vectors lentivirals pLKO.1-shNT i pLKO.1-shRSK4 sobre unes IMR90 en passe 30 i es van seleccionar. La inhibició d'RSK4 es va comprovar per RT-PCR a temps real (Figura 16 A). Un cop seleccionades les cèl·lules es van mantenir en cultiu realitzant dos passes a la setmana fins al passe 40, moment en el qual només les cèl·lules que contenien el vector control pLKO.1-shNT van desenvolupar trets característics de senescència. Es va determinar l'activitat SA-β-gal tant en IMR90-shNT com en IMR90-shRSK4 a passe 40 i es va observar que mentre que les cèl·lules IMR90-shRSK4 no presentaven activitat SA-β-gal, aquesta era molt abundant en IMR90-shNT (Figura 16 B). La línia cel·lular IMR90-shRSK4 es va mantenir en cultiu durant 15 passes més fins que les cèl·lules van adquirir una morfologia típicament senescent. En aquest moment es va determinar l'activitat SA-β-gal (Figura 16 C).

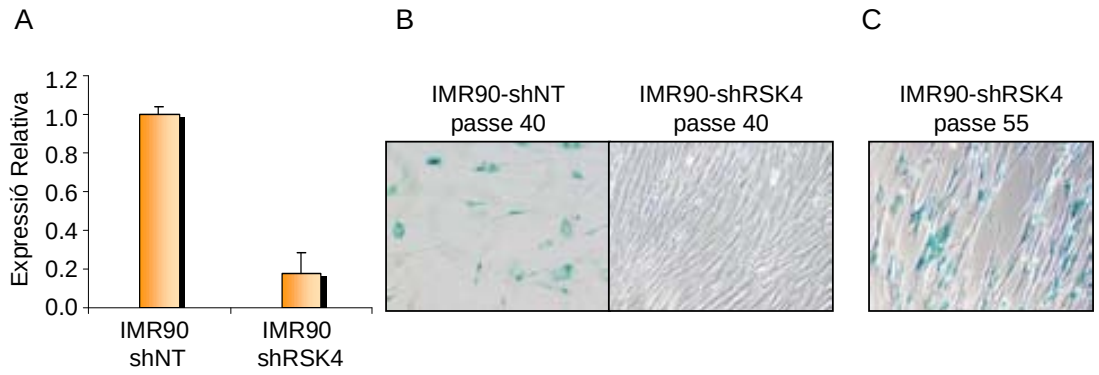


Figura 16. La inhibició d'*RSK4* fa incrementar la vida mitjana dels fibroblasts IMR90 A. Cèl·lules IMR90 es van infectar amb els vectors pLKO.1-shNT (shNT) o pLKO.1-shRSK4 (shRSK4) i 4 dies després de la selecció es van comprovar els nivells d'expressió d'*RSK4* per RT-PCR a temps real. **B**. IMR90-shNT i IMR90-shRSK4 es van mantenir en cultiu fins a passe 40, moment en que es va analitzar l'activitat SA-β-gal. **C.** Activitat SA-β-gal d'IMR90-shRSK4 en passe 55. Les imatges van ser preses al mateix augment (20x).

5.4.3 La inhibició d'RSK4 indueix resistència a l'OIS

KRAS i *BRAF* són dos oncogens que es troben freqüentment mutats a les fases inicials de la formació dels tumors i tots dos tenen la capacitat d'induir senescència tant *in vitro* con *in vivo*. A la Figura 9 s´ha observat que RSK4 es trobava disminuït en carcinomes de còlon així com en adenomes, fet que sembla indicar que la pèrdua d'expressió d'RSK4 també es produeix en les fases inicials de la tumorigènesi. L'OIS ha sigut proposada com una barrera enfront de la transformació cel·lular i, un cop observat que la pèrdua d'RSK4 pot contribuir al retard de la senescència replicativa, es va voler comprovar si la pèrdua d'RSK4 també pot evitar l'OIS i per tant contribuir al desenvolupament del càncer.

En un primer estudi en col·laboració amb el Dr. D.Peeper es van infectar les línies TIG3 i TIG3 p16null amb els vectors lentivirals pLKO.1-shNT i pLKO.1-shRSK4 i la inhibició d'RSK4 es va comporvar per RT-PCR a temps real (Figura 17 A). Un cop seleccionades les cèl·lules, es va realitzar una nova infecció, aquest cop amb un vector retroviral buit (pMB) o un vector d'expressió de $BRAF^{E600}$ (pMB-$BRAF^{E600}$). $BRAF^{E600}$ indueix senescència tant *in vitro* com *in vivo,* fins i tot encara que p16 estigui inhibit [31]. Per avaluar si les cèl·lules amb inhibició d'*RSK4* eviten l'aturada del cicle cel·lular induïda per $BRAF^{E600}$ i tenen una major capacitat proliferativa es va realitzar un assaig de formació de colònies. Dos dies després de la selecció es van sembrar les cèl·lules a baixa densitat i es van mantenir en cultiu durant 14 dies, moment en el que es van fixar les cèl·lules, es va determinar la formació de colònies i es va realitzar l'extracció de proteïnes.

Es va observar que $BRAF^{E600}$ induïa senescència en les cèl·lules infectades amb el vector control pLKO.1-shNT independentment de p16. La inhibició d'RSK4 amb el vector pLKO.1-shRSK4 rescatava parcialment l'aturada de la proliferació induïda per $BRAF^{E600}$ en TIG3. Tot i que la inhibició de p16 per sí sola no era suficient per evitar la senescència induïda per $BRAF^{E600}$, la inhibició simultànea de p16 i d'RSK4 evita l'aturada de la proliferació de forma més eficient que la inhibició sola d'RSK4 (Figura 17 B). L'expressió de BRAF es va comprovar per *Western blot* així com l'expressió de p16, que es veia incrementada en les cèl·lules amb sobreexpressió de $BRAF^{E600}$ (Figura 17 C).

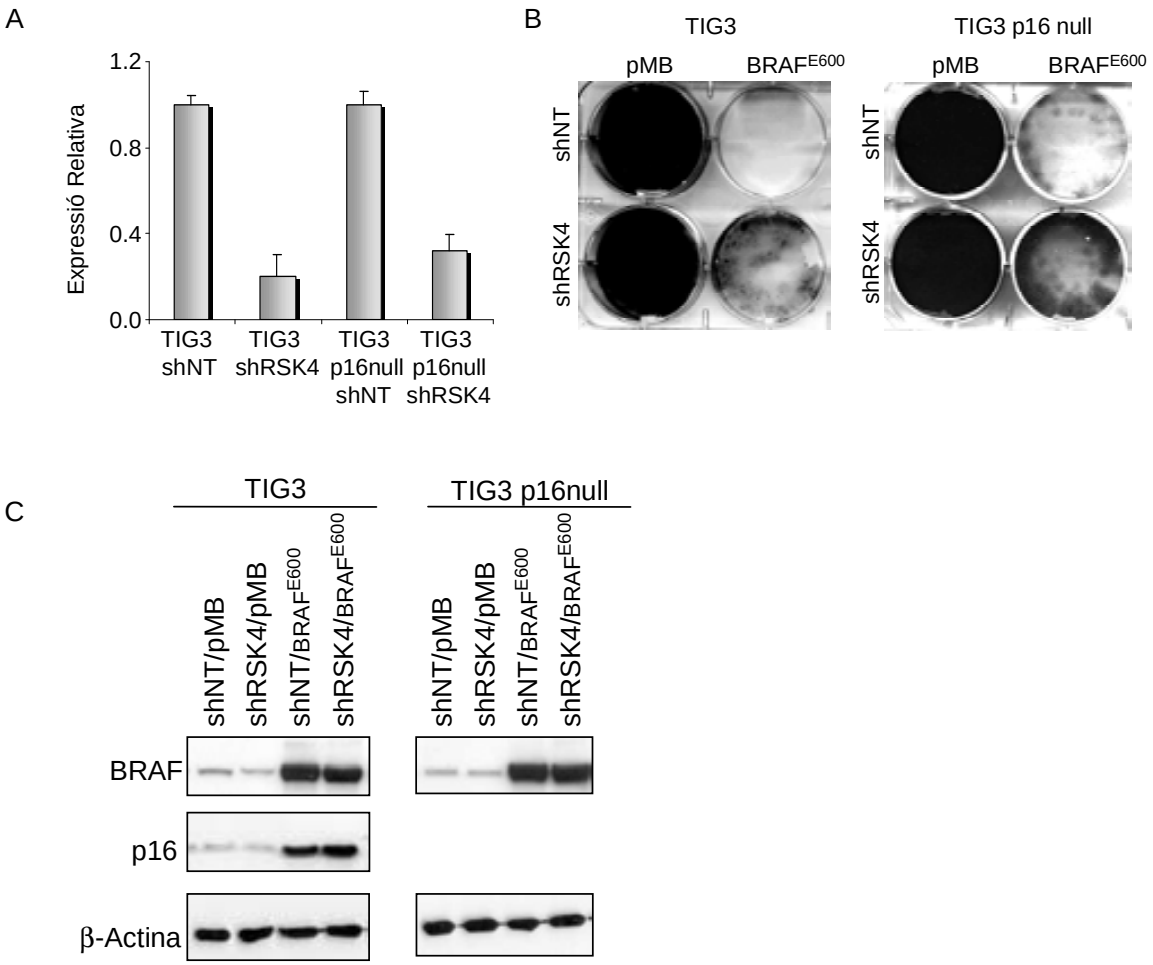


Figura 17. La inhibició d'RSK4 evita la senescència induïda per BRAF^{E600}

A. Cèl·lules TIG3 i TIG3 p16null es van infectar amb els vectors pLKO.1-shNT (shNT) o pLKO.1-shRSK4 (shRSK4) i 4 dies després de la selecció es van comprovar els nivells d'expressió d'*RSK4* per RT-PCR a temps real. **B**. Les cèl·lules TIG3 i TIG3 p16null infectades amb els vectors shNT i shRSK4 i seleccionades es van reinfectar amb el vector pMB o el vector pMB-BRAF^{E600} (BRAF^{E600}). Dos dies després de la selecció les cèl·lules es van sembrar a baixa densitat per realitzar un assaig de formació de colònies. Les cèl·lules es van mantenir en cultiu durant 14 dies fins que es van fixar i tenyir. **C**. En el mateix moment en el que es va parar l'assaig de formació de colònies es va realitzar l'extracció de proteïnes per avaluar l'expressió de BRAF i p16**.** La β-actina es va fer servir com a control de càrrega.

BRAF és un efector de RAS i per aquest motiu es va voler comprovar si la inhibició d'RSK4 també interfereix en la senescència induïda per KRAS. KRAS és un dels membres de la família de RAS que es troba mutat amb més freqüència en

carcinomes humans, per exemple aproximadament el 30-50% dels carcinomes colorectals presenten mutacions activants de *KRAS* [95, 96]. Per realitzar aquest objectiu es va seguir la mateixa estratègia que en el cas de BRAF i un cop es van seleccionar les cèl·lules amb els vectors d'interferència pLKO.1-shNT i pLKO.1-shRSK4 es van reinfectar amb un vector retroviral control (pBabe) o amb expressió de $KRAS^{V12}$ (pBabe-$KRAS^{V12}$). Aquesta forma mutada de *KRAS* fa que sigui constitutivament actiu i indueix senescència tant *in vivo* com *in vitro* [18, 90]. Dos dies després de la selecció es van plantar les cèl·lules a baixa densitat i es van mantenir en cultiu durant 14 dies. La primera observació va ser que $KRAS^{V12}$ només induïa senescència en les TIG3 però no el les TIG3 p16null (Figura 18).

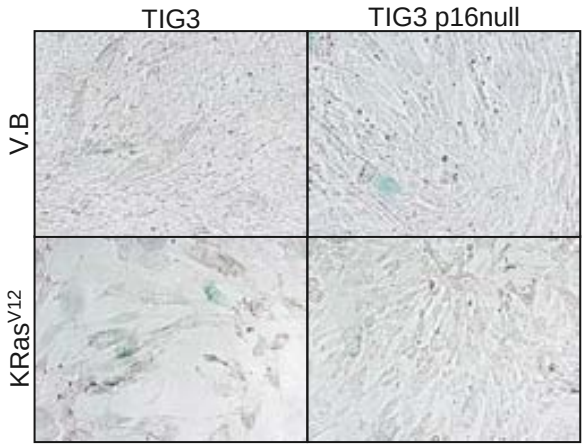


Figura 18. $KRAS^{V12}$ només indueix senescència en TIG3.

Cèl·lules TIG3 i TIG3 p16null van ser infectades amb pBabe vector buit (V.B) o pBabe-$KRAS^{V12}$. Dos dies després de la selecció les cèl·lules es van sembrar a la mateixa densitat i 4 dies més tard es va determinar l'activitat SA-β-gal.

Per altra banda, es va observar que la inhibició d'RSK4 era suficient per evitar l'aturada de la proliferació induïda per $KRAS^{V12}$ en les cèl·lules TIG3 (Figura 19 A). L'expressió de KRAS es va comprovar per *Western blot* així com l'expressió de p16, que es veia incrementada en les cèl·lules amb sobreexpressió de $KRAS^{V12}$(Figura 19 B).

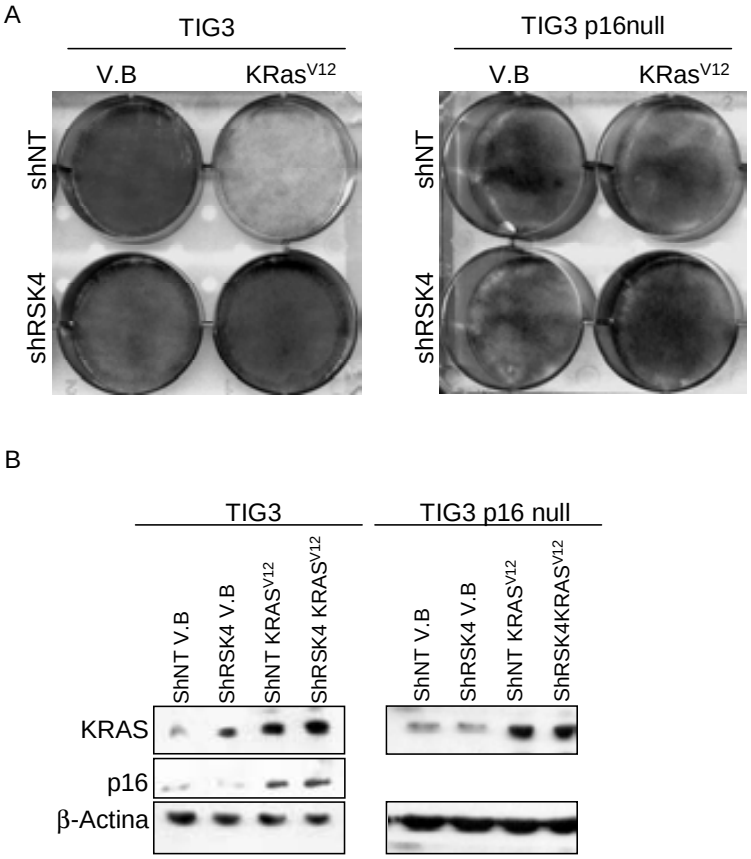


Figura 19. La inhibició de RSK4 evita la senescència induïda per *KRAS*.

A. Les cèl·lules TIG3 i TIG3 p16null infectades amb pLKO.1-shNT (shNT) o pLKO.1-shRSK4 (shRSK4) i seleccionades, es van reinfectar i seleccionar amb el vector pBabe (Vector Buit o V.B) o el vector pBabe-KRAS^{v12} (KRAS^{v12}). Dos dies després de la selecció les cèl·lules es van sembrar a baixa densitat per realitzar un assaig de formació de colònies. Les cèl·lules es van mantenir en cultiu durant 14 dies fins que es van fixar i tenyir. **B.** En el mateix moment en el que es va parar l'assaig de formació de colònies es va realitzar l'extracció de proteïnes per comprovar l'expressió de KRAS i p16 per *Western blot.* La β-actina es va fer servir com a control de càrrega.

5.4.4 La inhibició d'RSK4 incrementa la resistència d'HDFs a tractaments amb H_2O_2 i CDDP

Un cop observat que la inhibició d'RSK4 pot conferir resistència a la senescència es va comprovar si aquesta inhibició també confereix resistència a tractaments inductors de senescència i apoptosi. Per realitzar aquest objectiu es

van sembrar a la mateixa densitat HDFs amb inhibició o no d'RSK4 en plaques de 24 pouets i es van realitzar corbes de resistència a tractaments amb H_2O_2 i CDDP. Es va observar que tant en les IMR90 (Figura 20 A i B) com en les TIG (Figura 20 C i D) les cèl·lules on RSK4 estava inhibit eren més resistents a aquests tractaments.

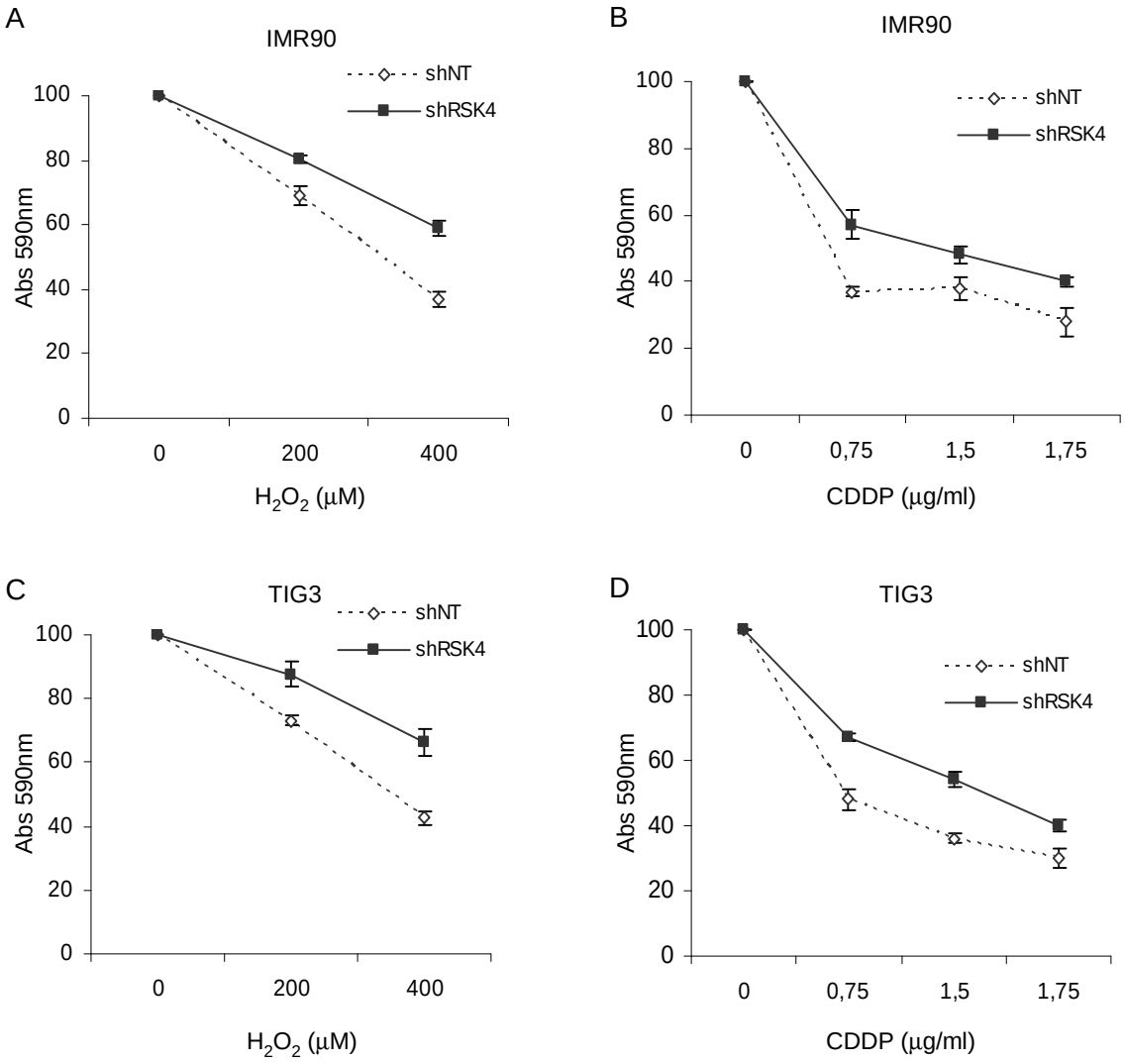


Figura 20. La inhibició d'RSK4 indueix resistència a H_2O_2 i CDDP en HDFs.
A-B. Corbes de resistència a H_2O_2 i CDDP corresponents a IMR90 infectades amb pLKO.1-shNT (shNT) o pLKO.1-shRSK4 (shRSK4) **C-D.** Corbes de resistència a H_2O_2 i CDDP corresponents a TIG3 infectades amb shRSK4 o shNT. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard entre duplicats.

5.4.5 La inhibició d'RSK4 incrementa la resistència d'HCT116 a tractaments amb CDDP però no amb H_2O_2

Tot i que com s´ha vist a la Figura 10 les línies de carcinoma de còlon tenien una expressió d'*RSK4* molt baixa comparat amb HEK293T o IMR90, es va observar que tractaments inductors de senescència amb H_2O_2 i CDDP produïen un increment de l'expressió d'*RSK4* de fins a 6 vegades (Figura 15). Per aquest motiu es va decidir infectar els dos models de carcinoma de còlon amb els vectors pLKO.1-shNT o pLKO.1-shRSK4. Després de comprovar la inhibició d'*RSK4* per RT-PCR a temps real (Figura 21 A), es van realitzar les corbes de resistència a H_2O_2 i CDDP i es va observar que tots dos models (amb p53wt i p53null) presenten resistència al tractament amb CDDP però no al tractament amb H_2O_2 quan s'inhibeix *RSK4* (Figura 21 B i C).

5.5 Mecanisme d'acció d'RSK4

5.5.1 La proteïna adenoviral E1A evita la senescència induïda per RSK4

Com s´ha observat a les Figures 11, 12 i 13, la sobreexpressió d'RSK4 induïa senescència no només en línies d'HDFs sinó també en línies cel·lulars de carcinoma de còlon, independentment de l'estatus de p53, p16 i KRAS (*p16* i l'oncogèn *KRAS* es troben mutats en la línia HCT116). Interessantment, la sobreexpressió d'RSK4 es va trobar associada a l'increment de p21 en totes les línies cel·lulars analitzades. Aquestes dades semblen indicar que la senescència mediada per RSK4 és independent de p53 i de p16 i que altres factors com p21 i RB deuen estar implicats.

En el model cel·lular IMR90 es va descriure per primera vegada l'OIS [32]. Avui dia es sap que si bé l'activació d'un oncogèn indueix senescència, si la cèl·lula acumula altres mutacions que afecten a les vies reguladores de senescència, les cèl·lules es poden immortalitzar i transformar. En el cas de les cèl·lules IMR90 s'ha observat que l'oncogèn *RAS*, que per si sol indueix senescència, si s'expressa junt amb la proteïna adenoviral E1A (que inhibeix entre

altres proteïnes a RB), les cèl·lules eludeixen els mecanismes de senescència i s'immortalitzen adquirint una morfologia molt més epiteloide i arrodonida [32].

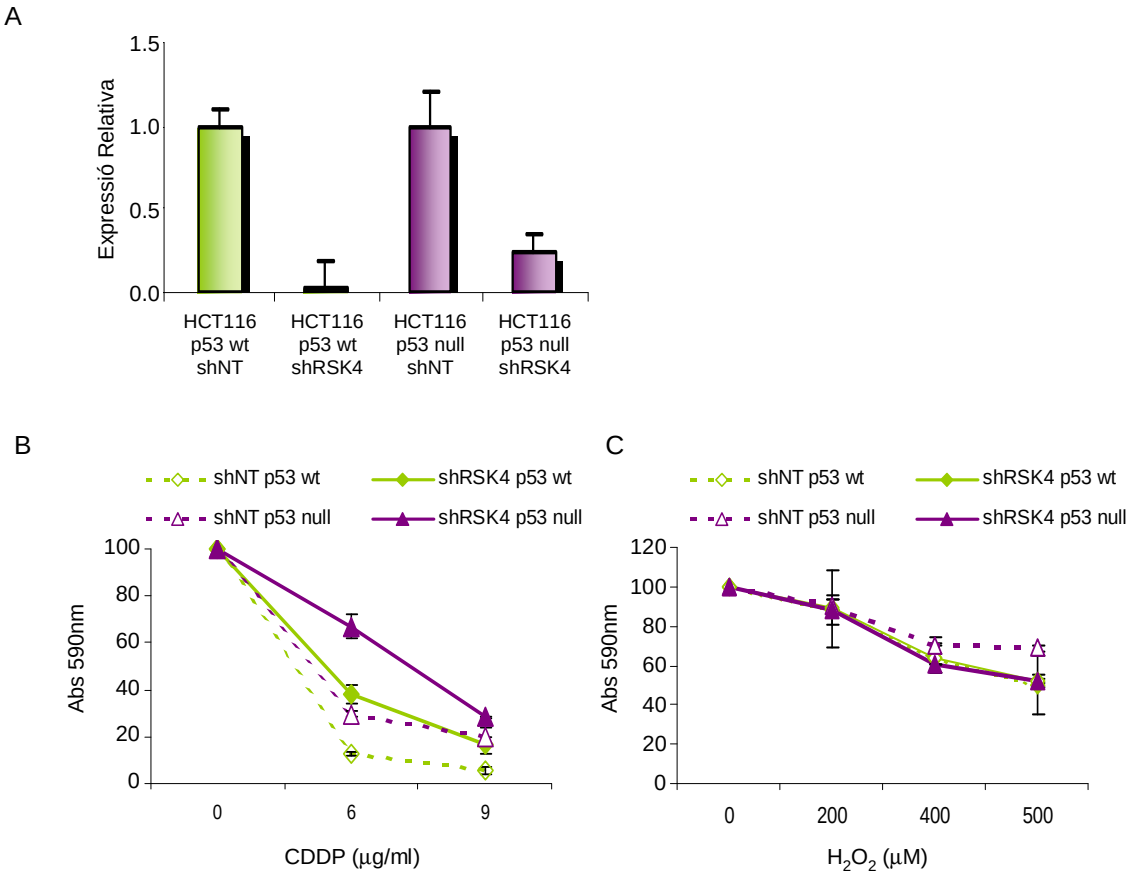


Figura 21. La inhibició d'RSK4 indueix resistència a CDDP però no a H_2O_2 en HCT116

A. Les línies cel·lulars HCT116 p53wt i HCT116 p53null es van infectar amb els vectors pLKO.1-shRSK4 (shRSK4) o pLKO.1-shNT (shNT) i 4 dies després de la selecció es van comprovar els nivells d'expressió d'*RSK4* per RT-PCR a temps real. **B i C**. Corbes de resistència a CDDP (B) o H_2O_2 (C) corresponents a HCT116 p53wt i HCT116 p53null infectades amb shNT o shRSK4. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard entre duplicats.

Per veure si E1A també evita la senescència induïda per RSK4, es va infectar la línia IMR90-Tx-E1A amb el vector retroviral pLPCX-GFP o pLPCX-RSK4. Un cop finalitzada la selecció dels vectors retrovirals, les cèl·lules es van sembrar i es va iniciar la inducció d'E1A amb tamoxifè. Es va observar que la inducció d'E1A provocava, tant en les cèl·lules amb sobreexpressió d'RSK4 com

en les control, un increment de la proliferació i un canvi morfològic (Figura 22 A) indicatiu de que E1A evita la senescència induïda per RSK4 i provoca la immortalització d'aquesta línia cel·lular [32]. L'expressió d'RSK4 es va comprovar per *Western blot* (Figura 22 B).

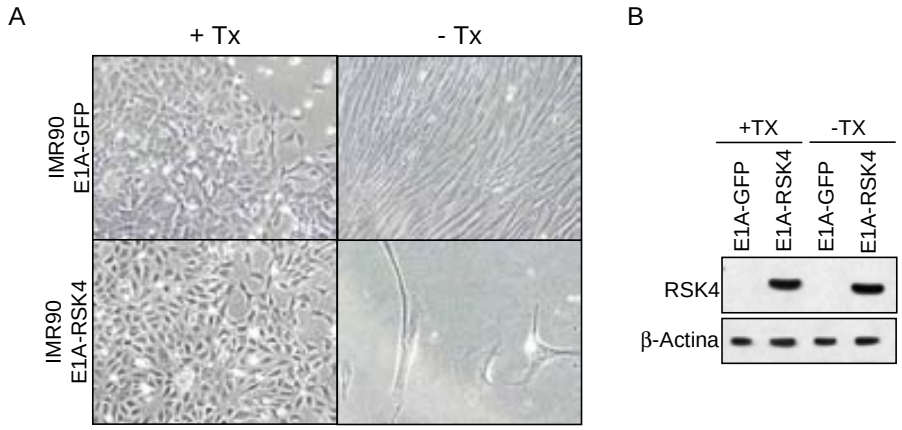


Figura 22. La proteïna adenoviral E1A evita la senescència induïda per RSK4
A. La línia cel·lular IMR90-Tx-E1A es va infectar amb els vectors retrovirals pLPCX-GFP o pLPCX-RSK4. Després de la selecció les cèl·lules es van plantar a la mateixa densitat, es van mantenir en cultiu amb 1 μM de tamoxifè (+ Tx) o amb metanol (- Tx) durant 10 dies i se'n va analitzar la seva morfologia. **B.** L'expressió d'RSK4 es va comprovar per *Western blot*. La β-Actina es va fer servir com a control de càrrega.

5.5.2 La inhibició d'RB evita la senescència induïda per RSK4

Una de les proteïnes que es veuen alterades per E1A és la proteïna RB. L'expressió d'E1A afecta al control normal de la interacció RB-E2F unint-se a la forma hipofosforilada d'RB i alliberant E2F. Per comprovar si la resistència a la senescència induïda per RSK4 pot ser deguda al fet de que E1A bloqueja a RB, es va infectar la línia cel·lular HCT116 p53wt amb els vectors retrovirals pLPCX-GFP i pLPCX-RSK4. Després de la selecció es van plantar les cèl·lules a la mateixa densitat i es van transfectar amb el siRNA d'*RB* i els controls necessaris. Les cèl·lules es van mantenir en cultiu durant 3 dies i es va determinar l'activitat SA-β-gal. La incorporació dels siRNAs es va monitoritzar amb el *Silencer Cy3-labeled GADPH siRNA*. Mentre que les cèl·lules amb sobreexpressió d'RSK4 i *Silencer Negative Control* deixaven de proliferar i presentaven activitat SA-β-gal, les cèl·lules amb sobreexpressió d'RSK4 i siRNA d'*RB* proliferaven de forma similar a

les cèl·lules infectades amb GFP (Figura 23 A). L'expressió d'RSK4 i RB es va comprovar 3 dies després de la transfecció per *Western blot* (Figura 23 B).

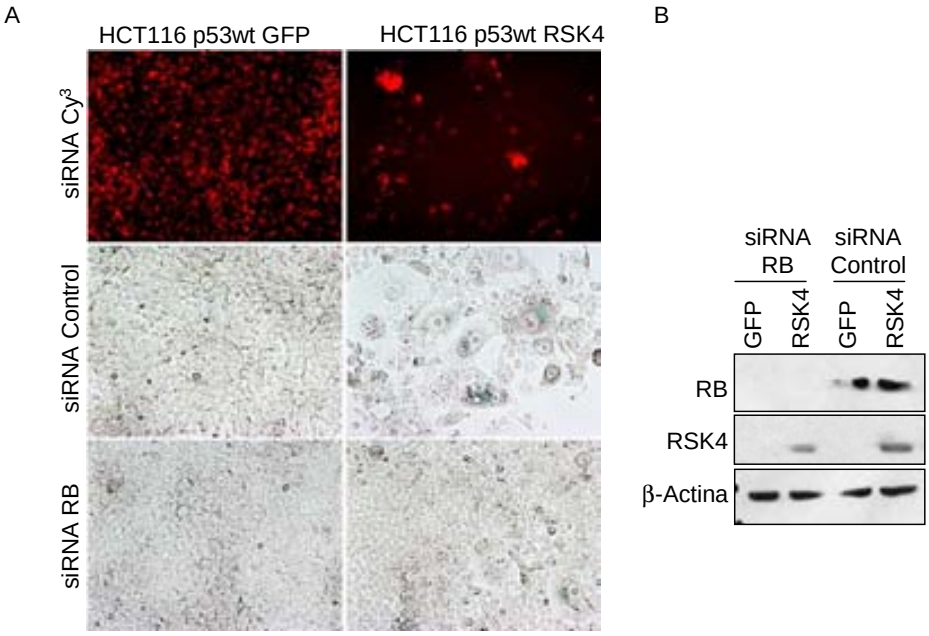


Figura 23. Efecte de la inhibició d'RB en la senescència mediada per RSK4.
A. Dos dies després de seleccionar les cèl·lules HCT116 p53wt infectades amb pLPCX-GFP o pLPCX-RSK4, les cèl·lules es van sembrar i es van infectar amb el siRNA d'*RB*, el *Silencer Negative Control siRNA* (siRNA Control), i el *Silencer Cy3-labeled GADPH* (siRNA Cy^3). Aquest últim ens permet monitoritzar la presència del siRNA amb llum fluorescent. Tres dies després de la selecció es va determinar l'activitat SA-β-gal. Les imatges es van prendre al mateix augment (20x). **B**. L'expressió d'RB i RSK4 es va analitzar per *Western blot* 3 dies després de la transfecció. La β-Actina es va fer servir com a control de càrrega.

5.5.3 RSK4 redueix el creixement de la línia de carcinoma de mama MDA-MB-468 però no indueix senescència.

Els resultats obtinguts en els apartats anteriors semblen indicar que perquè RSK4 pugui induir senescència és necessari que les cèl·lules expressin RB. Per confirmar aquestes observacions es va voler veure quin era l'efecte de la sobreexpressió d'RSK4 en una línia cel·lular amb mutacions al gen d'*RB* i descartar que l'efecte observat a IMR90 i a les línies de carcinoma de còlon no fos un efecte degut únicament a l'expressió d'RSK4 a nivells no fisiològics. Per aquest

motiu es va infectar la línia de carcinoma de mama MDA-MB-468; aquesta línia presenta mutacions tant a *RB* com a *p53*.

Es va repetir el mateix protocol d'infecció amb els vectors pLPCX-GFP i pLPCX-RSK4 i un cop seleccionades les cèl·lules es van realitzar corbes de creixement. En aquest cas es va observar que tot i que les cèl·lules infectades amb RSK4 presentaven una proliferació més lenta que les infectades amb GFP, aquesta proliferació no s'aturava (Figura 24 A). Quatre dies després de finalitzar la selecció es va realitzar l'extracció proteica i per *Western blot* es va confirmar que els nivells d'expressió d'RSK4 eren equiparables als obtinguts en HCT116, IMR90 i TIG3. De nou es va observar que RSK4 induïa un increment de p21 (Figura 24 B). Per veure si RSK4 induïa senescència o no en aquest model cel·lular, 2 dies després de la selecció les cèl·lules es van plantar en plaques de sis pouets i 4 dies després es va analitzar l'activitat SA-β-gal (Figura 24 C). A diferencia dels altres models cel·lulars estudiats, en aquest cas les cèl·lules amb sobreexpressió d'RSK4 no presentaven canvis morfològics ni activitat SA-β-gal.

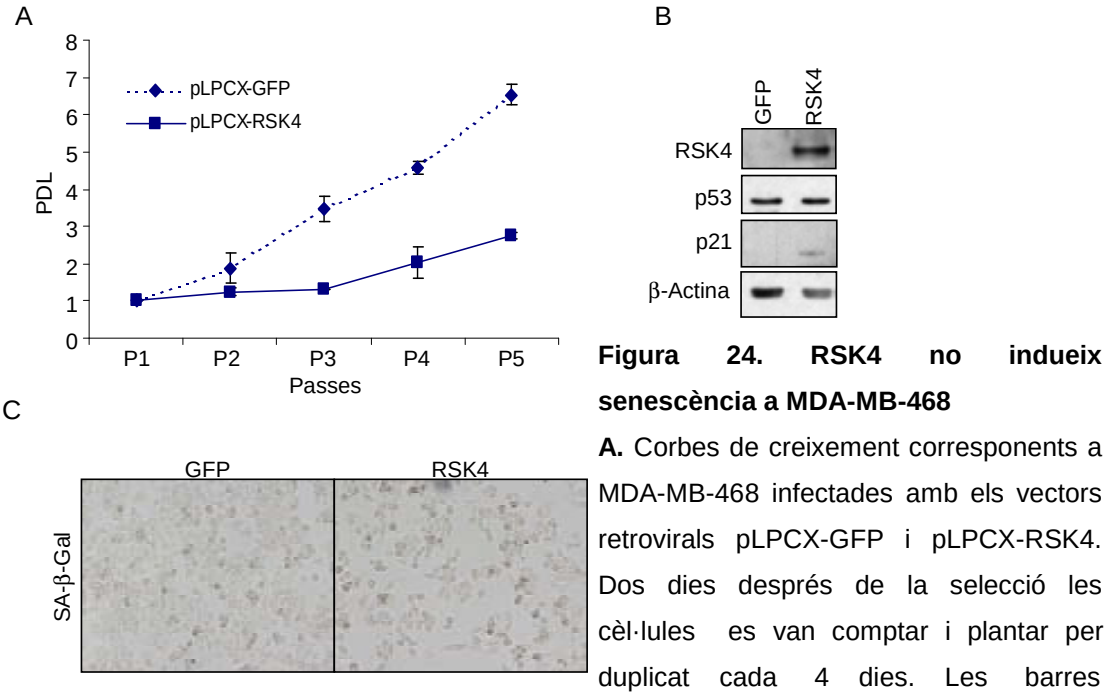


Figura 24. RSK4 no indueix senescència a MDA-MB-468

A. Corbes de creixement corresponents a MDA-MB-468 infectades amb els vectors retrovirals pLPCX-GFP i pLPCX-RSK4. Dos dies després de la selecció les cèl·lules es van comptar i plantar per duplicat cada 4 dies. Les barres d'error representen la desviació estàndard entre duplicats. **B**. Quatre dies després de la selecció els nivells d'expressió d'RSK4, p53 i p21 es van analitzar per *Western blot*. La β-actina es va fer servir com a control de càrrega. **C** Les cèl·lules infectades amb els vectors retrovirals pLPCX-GFP i pLPCX-RSK4 es van sembrar a la mateixa densitat i 6 dies després de la selecció es va analitzar l'activitat SA-β-gal. Les imatges es van prendre amb el mateix augment (20x).

5.5.4 La inhibició de p21 evita la senescència induïda per RSK4

En els experiments anteriors s´ha observat que la sobreexpressió d'RSK4 indueix un fenotip característic de senescència en tots els tipus cel·lulars que tenen RB actiu, independentment de l'estat de p16. RB és actiu en la seva forma hipofosforilada i es regula principalment pels CDKIs. Tot i que p16 és la principal CDKI que regula RB s'ha observat que p21 també pot activar a RB.

Per estudiar si p21 era necessari per la senescència induïda per RSK4, es van infectar quatre tipus cel·lulars diferents (HCT116 p53wt, HCT116 p53null, TIG3 i TIG3 p16null) amb el vector retroviral amb expressió de l'shRNA de *p21* pRetroSuper-shp21 o el vector control pRetroSuper. Un cop seleccionades, aquestes cèl·lules es van reinfectar amb els vectors pWZL-Blast o pWZL-Blast-RSK4 i es van seleccionar de nou. Dos dies després de la selecció, les cèl·lules es van sembrar a baixa densitat i es van mantenir en cultiu un mínim de 10 dies fins que les cèl·lules control van arribar a confluència, moment en el que les cèl·lules es van fixar i es va determinar la formació de colònies (Figura 25 A). En tots quatre tipus cel·lulars es va observar com la inhibició de p21 evitava la inhibició de la proliferació induïda per RSK4 independentment de p53 i de p16. L'expressió d'RSK4 i de p21 es va comprovar per *Western blot* (Figura 25 B). Tot i que la inhibició de p21 aconseguida amb el vector pRetroSuper-shp21 no va ser total era suficient per inhibir l'increment de p21 observat amb anterioritat en aquestes línies per la sobreexpressió d'RSK4.

5.5.5 Ni la inhibició de ROS, ni la inhibició de p38MAPK eviten la senescència induïda per RSK4

Tant el tractament amb H_2O_2 com el tractament amb CDDP poden activar la senescència com a conseqüència de la generació de ROS o del dany en el DNA. Aquesta senescència pot estar mediada per la via de p53 però també ho pot estar per la via de p38MAPK [43, 45]. La via de p38MAPKs està implicada en l'OIS [44, 97, 98], però també pot contribuir a la inducció de senescència en resposta a dany en el DNA, escurçaments de telòmers o acumulació de ROS [45, 99, 100].

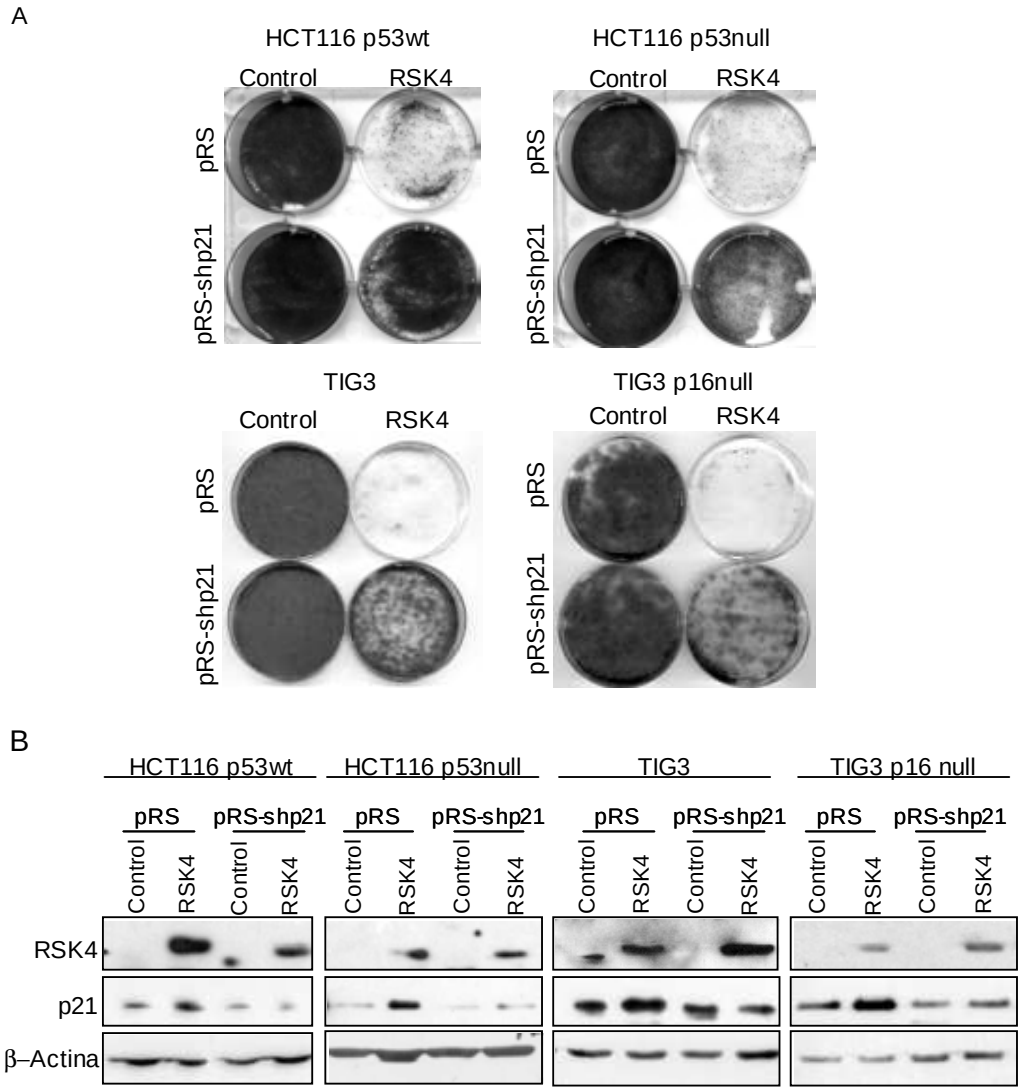


Figura 25. La inhibició de p21 evita la senescència induïda per RSK4

A. Les línies cel·lulars HCT116 p53wt, HCT116 p53null, TIG3 i TIG3 p16null infectades amb pRetroSuper-shp21 (pRS-shp21) o el vector pRetroSuper (pRS) i seleccionades, es van reinfectar amb pWZL-Blast (Control) o pWZL-Blast-RSK4 (RSK4) i es van seleccionar. Dos dies després de la selecció, les cèl·lules es van plantar i es va realitzar un assaig de formació de colònies. Les cèl·lules es van mantenir en cultiu durant 10-14 dies, moment en el que es van fixar i tenyir amb cristall violeta. **B.** Comprovació per *Western blot* de l'expressió d'RSK4 i de p21 4 dies després de la selecció. La β-actina es va fer servir com a control de càrrega.

En el cas d'RSK4 s´ha observat que la seva sobreexpressió induïa senescència de forma independent de p53, però dependent de p21. Recentment s'ha publicat que p38MAPK pot regular p21 de forma independent a p53 [101].

Per estudiar si RSK4 pot estar participant en la inducció de la senescència a través de la generació de ROS o a través de la via de p38MAPK, es van tractar les cèl·lules TIG3 infectades amb pLPCX-GFP o pLPCX-RSK4 amb el neutralitzant de radicals lliures NAC o amb l'inhibidor de p38α i p38β SB203580. Dos dies després de la selecció les cèl·lules es van sembrar en plaques de sis pouets per realitzar un assaig de formació de colònies. Les cèl·lules es van mantenir en cultiu durant 14 dies amb els tractaments corresponents. Ni el tractament amb NAC ni amb SB203580 produïa un increment de la proliferació de les cèl·lules amb sobreexpressió d'RSK4 (Figura 26 A). Tant la sobreexpressió de RSK4 com els nivells de p21 es van comprovar per *Western blot* 4 dies després d'iniciar els tractaments (Figura 26 B).

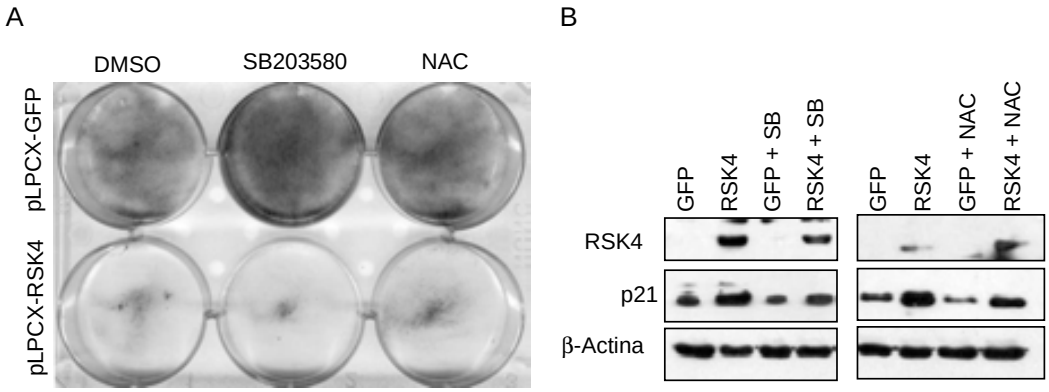


Figura 26. RSK4 indueix senescència en presència de NAC i de l'inhibidor de p38MAPKS.

A. Dos dies després de la selecció les cèl·lules TIG3 infectades amb els vectors retrovirals pLPCX-GFP o pLPCX-RSK4 es van plantar en plaques de sis pouets i es van mantenir en cultiu en presència d'una solució control (DMSO), de SB203580 8 μM o de NAC 1 nM durant 14 dies, moment en que es van fixar i tenyir amb cristall violeta. **B.** Anàlisi per *Western blot* de l'expressió de RSK4 i de p21 4 dies després d'iniciar el tractament amb una solució control, NAC o SB203580 (SB). β-Actina es va fer servir com a control de càrrega.

DISCUSSIÓ

6.1 Expressió d'RSK4 a tumors humans

Estudis previs d'expressió d'RSK4 per *Western blot* realitzats a teixit de ratolí han demostrat que aquesta proteïna presentava una major expressió a cervell, cor, cerebel, múscul esquelètic i ronyó [69]. En humans, però, encara es tenen poques dades, si bé segons la base de dades GeneAtlas, RSK4 s'expressa de forma ubiqua a tots els teixits humans analitzats, però en tots ells presenta una expressió molt baixa en comparació amb altres RSKs (www.geneatlas.org). Dummler *et al.* [69] ja van realitzar aquesta observació i van descriure que per immunoprecipitar RSK4 eren necessàries 10 vegades més de cèl·lules que per la resta d'RSKs. Degut a aquesta baixa expressió d'RSK4 i a la falta de bons anticossos, en aquest estudi es va analitzar l'expressió d'RSK4 a tumors humans amb la tècnica d'RT-PCR a temps real, ja que aquesta tècnica és molt sensible i permet treballar amb poca quantitat de teixit. Aquesta tècnica, però, necessita de l'ús de bons gens de referència per poder normalitzar els resultats, per aquest motiu es va realitzar un estudi previ per identificar el gen de referència adequat per comparar teixit normal *versus* teixit tumoral per a cada tipus de teixit a analitzar (còlon i ronyó).

Un estudi previ realitzat en el nostre laboratori on es va analitzar per RT-PCR a temps real l'expressió de diferents gens a carcinoma de còlon, carcinoma de pulmó i carcinoma de pròstata, indicaven que es produeix una *downregulació* significativa d'*RSK4* a carcinoma de còlon [65]. En el present estudi, s´ha analitzat l'expressió d'*RSK4* per RT-PCR a temps real i per *Western blot* (en alguns casos) en una sèrie més ample de tumors humans de còlon i de ronyó, observant-se una disminució significativa de l'expressió d'*RSK4* a carcinomes, tant a nivell d'expressió de l'mRNA com a nivell d'expressió de proteïna. El model de carcinoma de còlon és un bon model per estudiar la transformació cel·lular ja que la majoria de casos segueixen la seqüència proposada per Vogelstein *et al.* [102] d'hiperplasia-adenoma-carcinoma. L'anàlisi de l'expressió d'*RSK4* a adenomes va demostrar que ja en els tumors benignes existeix una pèrdua significativa de la seva expressió respecte al teixit normal, malgrat que també existien diferències entre adenoma i carcinoma, sent aquest últim el que mostrava una major *downregulació* del gen *RSK4*. En quatre pacients es va poder fer, per primera vegada, un seguiment de l'expressió d'*RSK4* en dues de les fases de la

transformació (adenoma i carcinoma) i en teixit normal, observant-se que en els quatre casos existia una tendència a la pèrdua progressiva de l'expressió d'*RSK4* com més avançat està el càncer. En un altre estudi fet a teixit de mama per Takhur *et al.* [74], es va observar per immunohistoquímica que RSK4 presenta una major expressió en ductes normals que en papil·lomes (lesions benignes de mama), tot i que sembla que reapareix en carcinomes ductals invasius. Encara que aquest treball no presenta cap anàlisi estadística, els resultats indiquen que també en mama es produeix la pèrdua d'expressió d'RSK4 a lesions preneoplàsiques benignes. Aquests resultats junt amb els obtinguts en el present estudi, suggereixen que la pèrdua d'RSK4 podria representar un avantatge proliferatiu i per tant ser important en les fases inicials de la transformació tumoral, tot i que cal tenir en compte que, com van descriure Hanahan i Weinberg [103], perquè un tumor es desenvolupi s´han de produir altres mutacions que permetin a les cèl·lules, a part d'evadir la senescència, adquirir autosuficiència als senyals de creixement, evasió de l'apoptosi i capacitat de generar angiogènesi, invasió i metàstasi.

La inhibició d'*RSK4* observada a carcinomes sembla no ser deguda a mutacions, ja que segons les bases de dades només s'han descrit dues mutacions en el gen *RSK4* de 320 mostres analitzades, incloent 32 mostres de carcinoma de còlon i 33 mostres de carcinoma de ronyó (www.sanger.ac.uk). Això fa pensar que un dels mecanismes més probables per explicar la seva inhibició en tumors sigui deguda a la metilació del seu promotor. Per altra banda, no cal oblidar que *RSK4* es troba localitzat al cromosoma X (Xq21). La regió cromosòmica Xq, és una regió on s´han observat delecions en nombrosos pacients amb càncer i per tant aquest també podria ser motiu del silenciament d'*RSK4* observat a diferents tumors humans. A més a més, és important recordar que a diferència de la resta de cromosomes, el cromosoma X té característiques específiques que condueixen a la seva inactivació durant fases inicials del desenvolupament de mamífers. Un dels dos cromosomes X és transcripcionalment silenciat en femelles per aconseguir equivalència de dosis amb els mascles, per tant la pèrdua d'heterozigositat d'un gen del cromosoma X pot resultar en la pèrdua de la funció d'un gen supressor tumoral en un sol pas.

6.2. Funció d'RSK4

RSK4 pertany a la família d'RSKs. Aquesta família de quinases s´ha relacionat principalment amb vies de senyalització que indueixen proliferació i supervivència. No obstant, RSK4 presenta una sèrie de diferències respecte a la resta de proteïnes de la família d'RSKs que el converteixen en un potencial supressor tumoral. RSK4 és una quinasa que es troba expressada i activa en situacions clíniques i fisiològiques específiques com el desenvolupament embrionari, la parada del cicle cel·lular dependent de p53 i situacions de deprivació de sèrum [8, 69, 104]. A més a més, s'ha proposat que RSK4 és un inhibidor de la via de RAS-MAPKs i s´ha descrit que juga un important paper en el control de la invasió de carcinoma de mama [88].

En el present estudi s´ha observat per primera vegada que la sobreexpressió d'RSK4 induïa, tant en cèl·lules tumorals com en fibroblasts humans no transformats, un fenotip que es caracteritzava per l'aturada de la proliferació, tot i la presència de sèrum en el medi, així com per un increment en l'expressió de p21 i de la forma hipofosforilada d'RB. A més a més, les cèl·lules presentaven grans canvis morfològics acompanyats d'activitat SA-β-gal i formació de SAHF. Aquestes observacions indicaven que la sobreexpressió d'RSK4 indueix un fenotip característic de senescència. A més, la senescència s'induïa de forma independent de p53 i de p16, ja que aquest fenotip es va observar, entre altres, a la línia TIG3 p16null i a la línia HCT116 p53null.

Perquè es produeixi la transformació neoplàsica és necessari que les cèl·lules acumulin una sèrie de mutacions, que entre altres alteracions, inhibeixin el programa de senescència, pel que fins fa poc es pensava que les cèl·lules tumorals haurien perdut la capacitat d'activar aquest programa. No obstant, a moltes línies cel·lulars tumorals s'ha descrit que les cèl·lules mantenen part dels mecanismes reguladors de la senescència. Sota certs estímuls o manipulacions genètiques, les cèl·lules tumorals poden entrar en un estat de senescència tot i presentar mutacions a factors claus en les vies de senescència, com són p53 o p16. S´ha descrit que la transfecció de gens inhibidors del creixement com p21, p16, RB i p53 en línies cel·lulars tumorals, indueix, de la mateixa manera que la sobreexpressió d'RSK4, un fenotip característic de senescència a diferents línies tumorals [56].

Les vies de p53 i les de p16/RB són les dues grans mediadores de la senescència. Avui dia existeix un cert consens de que la senescència s'activa a través d'una o de l'altra via, tot i que existeixen connexions entre elles principalment a través de p21. En els nostres experiments semblava que la sobreexpressió d'RSK4 a IMR90 comportava l'activació de les dues vies ja que s'observava un increment tant de l'expressió de p21 com de p16 quatre dies després de finalitzar la selecció. En altres treballs s'ha descrit que el dany en el DNA i la disfunció telomèrica també indueixen increment de p21 i de p16, tot i que amb una cinètica diferent [6]. Es produeix una primera activació de p21 que acaba disminuint, mentre que l'increment de p16 es produeix més tard però es manté durant més temps. Aquest model es pot interpretar com una resposta en la qual p21 participa en la iniciació de l'aturada del cicle cel·lular i p16 en el manteniment de la senescència o bé com una segona barrera de protecció per prevenir el creixement de cèl·lules danyades [6, 105, 106]. En el nostre estudi, l'increment de p21 i de p16 en IMR90 coincideixen en el temps, de manera que com s´ha descrit en altres treballs, aquest increment de l'expressió de totes dues proteïnes pot ser degut a que en una població cel·lular de fibroblasts en cultiu es pot produir un increment de p21 degut a un estrès concret i un increment de p16 degut a l'estrès que pateixen les cèl·lules pel manteniment en cultiu [21]. El fet de que en TIG3 no observem increment de p16 per la sobreexpressió d'RSK4, i que RSK4 pot induir senescència en absència de p16 (tant en TIG3 p16null com en HCT116) sembla indicar que RSK4 regula principalment l'activació de p21, i que l'activació de les dues vies (que va ser observada en IMR90) pot ser una característica específica d'aquesta la línia cel·lular.

6.3. Regulació d'RSK4 en senescència

El principal mecanisme de regulació de les RSKs és produeix a nivell post-transcripcional mitjançant la seva fosforilació i activació quan les cèl·lules reben estímuls mitogènics. En el cas d'RSK4 però, s´ha descrit que aquest és actiu de forma constitutiva, fins i tot en situacions de deprivació de sèrum. En el present estudi s´ha observat que la inducció de senescència replicativa en IMR90 i de senescència induïda per estrès als dos models de carcinoma de còlon produïa un

increment significatiu de l'expressió d'RSK4, el que indica que durant la senescència s'activa la transcripció d'aquest gen. En el cas del tractament amb H_20_2 a les línies de carcinoma de còlon, l'increment de l'expressió d'RSK4 era màxim a les 48 hores del tractament. Aquest retard entre l'inici del tractament i l'increment d'RSK4 fa pensar que RSK4 no és necessari per les fases inicials de la inducció de la senescència. Per altra banda, en tots el models cel·lulars on es va sobreexpressar RSK4 es va observar que quatre dies després de finalitzar la selecció hi havia un increment en l'expressió de p21. En altres estudis s'ha descrit que després dels tractaments que indueixen senescència, a les 24 h ja es detecta un increment en l'expressió de p21 que es manté molt elevat fins a les 72 h [91, 107]. RSK4 podria doncs, estar implicat en el manteniment de l'increment de p21 un cop la cèl·lula ha iniciat la resposta de senescència, ja que el desfasament entre l'increment de RSK4 (observat en el nostre estudi) i el de p21 (descrit en altres treballs) indica que no seria el responsable d'iniciar aquest increment de p21.

Avui dia encara no està clar com la cèl·lula decideix entre activar una aturada de cicle cel·lular reversible o irreversible, però un dels factors decisius sembla ser p21 i la durada del senyal, per exemple una reparació ràpida del DNA inhibiria l'activació de p21 el que permetria tornar a activar el cicle cel·lular, mentre que una reparació lenta o incompleta del DNA desencadenaria un senyal sostingut i s'activaria una aturada del cicle cel·lular irreversible [6]. Seria interessant estudiar si RSK4 participa en el manteniment d'aquests senyals durant el temps necessari per iniciar senescència.

Fins al moment a nivell transcripcional només s´han descrit dos factors de transcripció que poden regular RSK4. Aquests són HNF4α i c-MYC [87, 88]. HNF4α és un regulador central de la diferenciació hepatocel·lular i contribueix a la polaritat epitelial a òrgans com pàncrees, ronyó, intestí i còlon. S'ha proposat que aquesta funció de diferenciació pot estar mediada per RSK4 possiblement degut a la capacitat d'RSK4 de participar en la via de senyalització de RAS-MAPKs i en la regulació del cicle cel·lular [8, 86, 87]. En dos d'aquests teixits on RSK4 s´ha proposat com un possible regulador de la diferenciació (còlon i ronyó) en el present estudi es va observar una disminució de l'expressió d'RSK4 a carcinomes, pel que la pèrdua d'expressió d'RSK4 podria estar relacionada, no només amb la senescència, sinó també amb la desdiferenciació que pateixen les cèl·lules durant

la transformació cel·lular. Pel que fa a la relació d'HNF4α i senescència recentment s'ha descrit que la sobreexpressió d'HNF4α indueix apoptosi a la línia cel·lular d'hepatoma Hep3B i aturada del cicle cel·lular i senescència a la línia HepG2 [108]. Seria interessant estudiar si aquests efectes són deguts a la capacitat d'HNF4α d'activar l'expressió d*'RSK4*.

C-MYC és un proto-oncogèn que codifica per un factor de transcripció que regula un gran nombre de gens implicats en proliferació cel·lular, diferenciació i apoptosi. En molts tumors humans s´ha observat una amplificació i sobreexpressió de c-*MYC* i per això es creu que juga un important paper en la tumorigènesi. Com altres oncogens, també *c-MYC* pot activar senescència tant de forma independent del dany en el DNA [109] com a través de l'activació de DDR [110].

Seria interessant estudiar si HNF4α i c-MYC estan implicats en l'increment de la transcripció d'RSK4 observada en cèl·lules en senescència replicativa o en senescència induïda per H_20_2 o CDDP i si en els casos on aquests factors indueixen senescència es produeix un increment de l'expressió d'RSK4.

Per altra banda, Berns *et al.* [8] van situar a RSK4 en la via de senyalització de p53, el que pot fer pensar que p53 podria participar en la regulació transcripcional d'*RSK4*. No obstant, en el present estudi, l'increment en l'expressió endògena d'*RSK4* en senescència es va observar també en HCT116 p53null, el que fa pensar que p53 no participa en la regulació transcripcional d'*RSK4*.

6.4 Efecte *in vitro* de la inhibició d'RSK4

La pèrdua dels mecanismes reguladors de la senescència és un dels passos inicials en el procés de tumorigènesi. Les mutacions o el silenciament de gens supressos tumorals relacionats amb la senescència és un fet indispensable perquè la cèl·lula pugui desenvolupar totes les funcions necessàries per poder transformar-se, infiltrar-se i colonitzar nous teixits [49, 52].

El gen *p53* es troba inactivat en aproximadament el 50% dels tumors humans, però encara n´hi ha més que tenen mutacions a altres gens de la via de p53 [111]. Com ja s´ha comentat, també són freqüents les mutacions en p16 i RB i per tant es considera que aquestes mutacions són importants per la progressió tumoral. Aquestes alteracions, però, no són un fet precoç en la transformació

tumoral, pel que altres mutacions que afectin al control de la senescència es deuen produir en fases inicials de la transformació. En aquest estudi s'ha descrit que RSK4 es trobava mutat, o més concretament, silenciat no només en un alt nombre de carcinomes de còlon i carcinomes renals, sino també en adenomes de còlon, indicant que aquest silenciament es produeix en fases primerenques de la tumorigènesi.

En el cas de la senescència replicativa, sembla que a la majoria de models cel·lulars humans la inhibició de p53, de p21 o d'RB és suficient per evitar-la, mentre que no ho és la inhibició de p16 [21, 112, 113]. En aquest estudi hem comprovat *in vitro* com la pèrdua d'expressió d'RSK4, igual que succeeix amb la inhibició de p21, p53 o RB, també era suficient per incrementar la vida mitjana de fibroblasts humans diploides. S´ha descrit que les cèl·lules que mantenen l'expressió de p21 però no de p16 entren en senescència replicativa, mentre que al revés no succeeix el mateix i les cèl·lules en lloc d'activar senescència moren per crisi mitòtica. La crisi mitòtica succeeix en cèl·lules humanes que escapen de la senescència replicativa, el que causa una extensa inestabilitat genòmica que provoca la mort cel·lular [6]. S'ha proposat que la diferència de resposta entre fibroblasts que mantenen expressió de p21 i fibroblasts que mantenen expressió de p16, pot ser degut a que en cèl·lules sense p16 es produeix una acumulació de p21 fins a nivells tant alts que p21 pot inhibir totes les CDKs de la fase del cicle cel·lular G1 i activar una aturada del cicle cel·lular; mentre que en el cas contrari no es produeix un acúmul de p16 suficient [113, 114], sense oblidar que p21 és un inhibidor de CDKs més global que p16 i també pot inhibir el complex ciclina D-CDK4 [21].

Com ja s´ha comentat, la sobreexpressió d'RSK4 indueix un increment de p21 a tots el models cel·lulars estudiats, pel que una explicació al retard de la senescència replicativa degut a la inhibició d'RSK4, podria ser que la inhibició d'RSK4 afectés als nivells d'expressió de p21, evitant o retardant que aquests arribin a superar el llindar necessari per activar senescència. Per tant, la pèrdua d'RSK4 podria provocar que les cèl·lules normals fossin més insensibles als senyals que reconeixen dany en els telòmers i que indueixen senescència replicativa, concedint a les cèl·lules més temps per proliferar i adquirir noves mutacions.

In vivo i en relació al càncer, l'OIS sembla ser un dels principals mecanismes de defensa de les cèl·lules en front a la transformació cel·lular. Les mutacions en oncogens es produeixen en fases inicials de la tumorigènesis, produint inicialment un augment en la proliferació que activa la resposta de senescència. Quan aquest mecanisme de defensa es veu alterat, el tumor pot continuar proliferant. En adenomes de còlon, es va observar que ja existia una disminució de l'expressió d'RSK4, indicant que aquesta també es produeix en fases inicials de la transformació tumoral. Per aquest motiu es va analitzar com afectava la pèrdua d'expressió d'RSK4 a l'OIS.

L'oncogèn amb el qual s'han realitzat més estudis de senescència és *HRAS*. Aquest pertany a la família de proteïnes RAS i en eucariotes s'han identificat tres membres d'aquesta família: H-, K-, i NRAS. S'han descrit mutacions activadores d'aquests gens en el 30% dels càncers humans. Aquestes mutacions, principalment en els codons 12, 13 i 63, són mutacions activadores amb potencial oncogènic i es produeixen en les fases inicials de la transformació tumoral [115].

Tot i que la majoria d'estudis relacionats amb senescència s'han realitzat amb l'oncogèn *HRAS*, les mutacions observades en tumors humans es produeixen principalment en *KRAS* i són altament freqüents en carcinomes de pulmó, pàncrees i còlon [95]. Per aquest motiu, i degut al fet de que la inhibició d'*RSK4* es va observar en adenomes de còlon, i a carcinomes de colon les mutacions de *KRAS* es troben en aproximadament el 30-40% dels tumors, es va decidir treballar amb l'oncogèn *KRAS.*

El segon oncogèn que es va analitzar en el present estudi era *BRAF*, que és un membre de la família RAF composada per ARAF, BRAF i CRAF. Aquestes proteïnes són els principals efectors de RAS i participen en la via de senyalització d'ERK, connectant els senyals extracel·lulars amb la regulació transcripcional. De les tres isoformes, BRAF és la que es troba mutada majoritàriament en càncer, concretament en un 70% dels melanomes i en un 10% dels càncers colorectals. [116, 117]. Possiblement degut a que la seva activació constitutiva necessita pocs esdeveniments mutacionals (de fet el 80% de les mutacions de *BRAF* a tumors consisteix en una única substitució V600E). Aquesta mutació comporta l'activació de la via de senyalització de RAS-MAPKs de forma independent a RAS, i de fet mutacions en *KRAS* i *BRAF* són excloents en la majoria de tumors humans. Tot i que RAF és un efector de RAS, RAS també pot activar altres vies incloent la de

PI3K, per tant les conseqüències de mutacions en *KRAS* o en *BRAF* no han de ser necessàriament les mateixes.

La primera observació realitzada en aquest estudi va ser que, mentre que BRAF induïa senescència tant en HDFs normals com en HDFs sense expressió de p16, KRAS només era capaç d'induir senescència en HDFs amb expressió de p16. S'ha proposat que perquè l'activació de RAS activi senescència la intensitat del senyal ha de superar un cert llindar i que nivells baixos de *KRAS* són insuficients per activar senescència tot i que causen un increment de la proliferació i lesions hiperplàsiques [35]. Tenint en compte que la sobreexpressió de KRAS es va realitzar en paral·lel en TIG3 i TIG3 p16null (i es va repetir l'experiment tres vegades) sembla que en aquest cas la diferència de resposta entre els dos tipus cel·lulars no seria la intensitat del senyal sinó la presència o no de p16.

En termes generals es considera que en cèl·lules humanes l'activació de RAS activa de forma paral·lela la via de p53 i la via de p16/RB [3, 21]. En referència a la necessitat de p16 en la senescència induïda per RAS existeixen moltes contradiccions i, mentre que alguns treballs indiquen que la pèrdua d'expressió de p16 és suficient per evitar la senescència induïda per *RAS* en fibroblasts de Leiden i fibroblasts Q34 [118, 119], altres grups han vist que és necessària la disrupció de totes dues vies per suprimir la senescència induïda per *RAS* en les línies de fibroblasts IMR90 [32], BJ [49] i LF1 [114, 120]. Una de les teories que s'ha proposat per explicar aquestes contradiccions és que RAS només indueix senescència en cèl·lules que prèviament hagin estat sotmeses a altres tipus d'estrès (que provoquin l'acúmul de p16) i per tant les condicions experimentals serien decisives [121]. Un altre concepte que cal tenir en compte és que la majoria d'aquests treballs es van realitzar fent servir HRAS. En un estudi comparatiu entre HRAS i KRAS es va observar que la sobreexpressió d'HRAS pot induir senescència en la línia cel·lular d'osteosarcoma U2OS, que no expressa p16 ni ARF, mentre que KRAS no pot activar l'aturada del cicle cel·lular en aquesta línia [90]. A més a més, mentre que els ratolins *knock out* de *KRas* són letals, no ho són els de *HRas* o *NRas* [122-124], indicant que aquests oncogens fan servir vies de senyalització diferents. En el present estudi hem observat que la inhibició d'RSK4, d'igual manera que succeïa amb la inhibició de p16, també era suficient per evitar la senescència induïda per KRAS. Aquests resultats indiquen que altres mecanismes, apart de p16, són necessaris per induir senescència en resposta a

KRAS, ja que p16 no era suficient per induir senescència en resposta a *KRAS* quan RSK4 estava inhibit.

En el cas de la senescència induïda per $BRAF^{V600E}$, s'ha descrit que tot i que la seva sobreexpressió indueix p16, ni la inhibició de p16 [31, 34] ni la de p53 [125] són suficients per superar la senescència induïda per BRAF. En aquest estudi hem demostrat que la inhibició d'RSK4 sí que pot, al menys en part, evitar la senescència mediada per $BRAF^{V600E}$.

Per altra banda, per comprovar la importància d'RSK4 en la resposta a tractaments inductors de senescència i apoptosi, es va inhibir l'expressió d'RSK4 a diferents models cel·lulars i es van realitzar corbes de supervivència en resposta a tractaments amb H_20_2 i CDDP. En el cas d'HDFs la inhibició d'RSK4 feia incrementar la supervivència cel·lular. Aquests increments en la supervivència indiquen que la inhibició d'RSK4 confereix un avantatge proliferatiu enfront a aquests tractaments, pel que aquestes cèl·lules serien més resistents a apoptosi i/o a senescència, que són els dos mecanismes cel·lulars que s'activen com a resposta a aquests tractaments. En el cas de les línies de carcinoma de còlon, la inhibició d'RSK4 només conferia resistència als tractaments amb CDDP, i no als tractaments amb H_20_2, tot i que tots dos tractaments indueixen dany en el DNA. Això indicaria que existeixen diferències en les vies de senyalització activades com a resposta del dany en el DNA causat per un quimioteràpic com el CDDP i el dany causat per acúmul de ROS. Interessantment, les cèl·lules HCT116 p53wt i p53null mostraven un increment similar en la resistència a tractaments amb CDDP, indicant que l'apoptosi no es l'únic mecanisme implicat en aquest augment de la supervivència, ja que p53 és el principal activador d'apoptosi en resposta a CDDP [126].

Les diferències observades entre les línies de fibroblasts (on la inhibició d'RSK4 induïa resistència als dos tipus de tractaments) i les de carcinoma de còlon, indiquen que diferents models cel·lulars poden respondre de diferent manera a un estrès concret i que depenent del tipus cel·lular la pèrdua d'expressió d'RSK4 pot tenir més o menys rellevància en respostes cel·lulars inductores de senescència o supervivència. Seria interessant realitzar més estudis de resistència a tractaments en línies tumorals sense RSK4, ja que la seva inhibició podria predir la resposta que tindrà un tumor enfront a un tractament.

6.5 Mecanisme d'acció d'RSK4

Avui dia es considera que la via de p53 regula principalment la senescència induïda per disfunció telomèrica o dany en el DNA i s'ha descrit que la inhibició de p53, de p21 o d'RB, però no la inhibició de p16, evita la senescència replicativa [113]. La via de p16/RB regula principalment la senescència induïda per activació d'oncogens i altres tipus d'estrès. No obstant l'OIS també activa la via de p53 ja que es produeix dany en el DNA. En el cas d'RSK4 hem observat que la seva inhibició retrasava la senescència replicativa i evitava l'OIS. Per intentar clarificar en quina de les dues vies de regulació de senescència participa RSK4, inicialment es van fer servir per aquest estudi línies cel·lulars normals, línies sense expressió de p53, línies sense expressió de p16 i línies sense expressió de p16 ni de p53. Interessantment, en tots els tipus cel·lulars estudiats la sobreexpressió d'RSK4 induïa un fenotip característic de senescència. Aquests resultats suggereixen que RSK4 no participa en l'activació clàssica de les vies de p53 i p16/RB, ja que ni p53 ni p16 són necessaris en la via de senyalització regulada per RSK4, però no es pot descartar que RSK4 participi en l'activació d'altres efectors *downstream* de p53 i p16, com p21 o RB.

El gen *RB* es troba mutat a molts tumors humans incloent el retinoblastoma hereditari, carcinomes de pulmó, de mama i de bufeta [127] i juga un paper crític en el control i el manteniment de la senescència. RB presenta una forta homologia amb p107 i p130 i totes tres proteïnes poden interaccionar i regular membres de la família d'E2F i són regulades durant el cicle cel·lular per les CDKS, motiu pel qual s'ha proposat que poden tenir papers redundants. En models murins s'ha vist que cèl·lules sense Rb poden entrar en senescència si p107 i p130 són normals [127, 128]. Tot i que aquests resultats indiquen un possible paper redundant d'aquesta família de proteïnes, també s'ha descrit que poden tenir funcions cel·lulars i de desenvolupament diferents, i RB sembla tenir un paper més específic en el control de la regulació gènica en diferenciació cel·lular i senescència [129]. Per comprovar si RB és necessari per la senescència induïda per RSK4, en aquest treball es van realitzar diferents experiments. Inicialment es va treballar amb un model cel·lular amb expressió de la proteïna adenoviral E1A. L'activitat d'aquesta proteïna es podia induir amb tractaments de tamoxifè. Moltes proteïnes adenovirals, com E1A, SV40 o antigen T, immortalitzen cèl·lules primàries quan s'expressen per si soles

però cooperen amb oncogens com *RAS* en la transformació cel·lular i per exemple, la coexpressió d'E1A amb RAS és suficient per evitar la senescència induïda per RAS [32]. En aquest estudi es va observar que l'activació d'E1A provocava un evident canvi morfològic dels fibroblasts que adquirien una morfologia molt més epitelioide i un creixement en monocapa, independentment de la sobreexpressió d'RSK4, indicatiu d'immortalització [32]. Part de la capacitat d'E1A d'evitar la senescència induïda per RSK4 pot ser deguda a que E1A té la capacitat de bloquejar les funcions d'RB evitant d'aquesta manera els mecanismes de regulació i aturada del cicle cel·lular. No obstant, E1A també pot afectar a altres proteïnes de la cèl·lula incloent factors de transcripció. Per aquest motiu es va comprovar que la inhibició amb siRNA d'RB era, per si sola, suficient per evitar la senescència induïda per RSK4.

Un dels problemes que suposa treballar amb vectors retrovirals, és que el gen d'interès es troba regulat per un promotor que fa que aquest s'expressi de forma molt elevada. Per confirmar que els efectes observats per la sobreexpressió d'RSK4 no eren únicament deguts a l'estrès causat a les cèl·lules per l'expressió d'RSK4 a nivells no fisiològics, es va sobreexpressar RSK4 a la línia MDA-MB-468 que té mutacions a *RB* i *p53*. Es va triar aquest model ja que segons els resultats obtinguts, en no tenir RB, aquest model hauria de ser resistent a la senescència induïda per RSK4. Els resultats obtinguts van confirmar aquesta hipòtesi ja que tot i que les cèl·lules proliferaven més lentes, no es produïa ni aturada de la proliferció cel·lular ni increment de l'activitat SA-β-gal. El creixement més lent observat pot ser degut a la funció d'RSK4 com inhibidor de la via de RAS-MAPKs [86] i a que les cèl·lules amb RSK4 presentaven un increment en l'expressió de p21.

RB és regulat principalment a traves de p16 que inhibeix els complexes Ciclina D/CDK4-6 i de fet *p16* i *RB* presenten un patró de mutacions excloent a la majoria de tumors humans: tumors on s'ha perdut p16 mantenen expressió d'RB, mentre que tumors on s'ha perdut RB expressen p16 [111]. No obstant, en senescència RB també pot ser activat a través de la via p53/p21.

Per estudiar si la senescència induïda per RSK4 era dependent de p21 es va utilitzar el model d'HDFs amb expressió ectòpica d'hTERT i de receptor ecotròpic TIG3. Aquests fibroblasts permeten unes millors condicions d'estudi ja que tenen una major eficiència d'infecció i no tenen una vida mitjana tant curta, comparat amb IMR90. L'expressió ectòpica d'hTERT pot immortalitzar els HDFs ja que evita la

senescència replicativa però no afecta a altres tipus de senescència independents de telòmers, com l'activació d'oncogens o el dany en el DNA [6] i de fet la sobreexpressió d'RSK4 en aquest model també induïa senescència.

De la mateixa manera que es va observar amb la inhibició d'RB, la inhibició de p21 amb shRNA a línies de fibroblasts i a les línies de carcinoma de còlon evitava la inhibició de la proliferació induïda per RSK4. Així doncs sembla que la via de senyalització a través de la qual RSK4 pot induir senescència depèn tant d'RB com de p21, suggerint que RSK4 regularia a p21, aquest a RB i d'aquesta manera s'activaria la senescència, tot i que no podem descartar que RSK4 també actui sobre altres factors.

A diferència de p16 i RB, en tumors humans les mutacions de p21 són rares. No obstant, s'ha observat que els ratolins *knock out* per p21 són més susceptibles a desenvolupar tumors i que en ratolins amb *p53* mutat però que mantenen *p21 wild type*, l'aparició de tumors espontanis és molt més lenta que en aquells ratolins que tenen mutats tant *p53* com *p21* [130]. Això suggereix que la deleció o inhibició de p21 pot contribuir a la tumorogènesi. Els resultat obtinguts en aquest treball confirmen el resultat obtingut per Berns *et al.* [8] on la inhibició d'RSK4 provocava una disminució en l'expressió de p21 tant a nivell d'mRNA com de proteïna. La inhibició d'RSK4 a cèl·lules humanes podria tenir com a conseqüència una disminució en l'expressió de p21 i per tant incrementar la susceptibilitat a la transformació cel·lular. El que queda sense determinar és si l'efecte d'RSK4 sobre l'expressió de p21 és directe o indirecte. RSK4 podria ser un mediador indirecte de la via de p53 que actuaria fosforilant alguna proteïna del complex d'activació transcripcional del promotor de p21 o participaria en l'estabilització de l'mRNA de p21 en el citoplasma, ja que es tracta d'una proteïna ribosomal. El que sí podem afirmar és que RSK4 pot induir l'increment de p21 en absència de p53. Tot i que *p21* es va identificar com el primer gen activat per p53 [131], avui dia es coneixen altres vies independents de p53 que poden actuar sobre el promotor de p21 activant la seva transcripció, com SP1, SP3 i STAT [132] [133]. Seria interessant estudiar si la relació entre RSK4 i p21 podria estar mediada per algun d'aquests mecanismes.

Així doncs, els resultats presentats en aquest estudi demostren per primera vegada que RSK4 pot participar en la via de senyalització que activaria RB a través de p21. Tot i que encara no s'ha establert el mecanisme exacte d'aquesta

activació, aquest estudi indica que és independent de p53. L'existència de vies de senyalització que permetin activació d'RB, independentment del estatus de p53 i de p16, suposa una doble barrera de seguretat enfront de la transformació tumoral. La inhibició de p21 però, no era suficient per revertir completament el fenotip induit per RSK4, ja que les cèl·lules amb RSK4 i inhibició de p21 proliferaven més lentes que les control. Aquest fet pot ser degut a que amb l'shRNA de p21 no es va aconseguir inhibir totalment p21. No obstant, en OIS sembla que p21 no és del tot necessari i per exemple s´ha descrit que, tot i que p21 incrementa en fibroblasts humans en resposta a *RAS* [32, 90, 114], la seva inhibició no es suficient per evitar la senescència induïda per *HRAS* [114]. En el cas de BRAF, s´ha descrit en diferents models cel·lulars que p21 no incrementa en resposta a la sobreexpressió de BRAF [31, 98, 134]. En el present estudi s´ha observat que la inhibició d'RSK4 sí que suprimeix en part l'OIS, el que indica que RSK4 pot estar afectant altres factors, a part de p21, que participen en la regulacio de la senescència.

En aquest sentit, s'ha descrit que l'expressió de $BRAF^{V600E}$ a cèl·lules primàries indueix senescència perquè incrementa la síntesi i la secreció d'IGFBP7 que actua de forma autocrina i paracrina inhibint la via de BRAF/MEK/ERK [135]. Un mecanisme de *feedback* negatiu també va ser descrit per RAS en neurofibromes [33]. Tot i que en el present estudi s´ha estudiat la relació d'RSK4 amb p21 i s'ha observat que p21 és necessari per la senescència induïda per RSK4, RSK4 va ser descrit l'any 2004 com un inhibidor de la via RAS-MAPKs [86], pel que aquest paper d'RSK4 també pot ser important en la regulació de la senescència i s´ha proposat que la pèrdua de factors encarregats de mantenir aquest *feedback* negatiu contribuirien a la tumorogènesi.

Els tractaments amb dosis subcitotòxiques d'H_20_2 i CDDP poden induir senescència tant en línies cel·lulars normals com en línies tumorals mentre que a concentracions més elevades indueixen apoptosi [56]. Aquests tractaments poden activar la resposta DDR i per tant l'activació de p53 [136]. En el cas de la senescència induïda per RSK4 però, s'ha observat en aquest estudi que l'activació de p53 no és necessària, el que indica que la sobreexpressió d'RSK4 no indueix senescència degut a que generi dany en el DNA, o si ho fa, indueix senescència a través d'una via de senyalització independent de p53. S'ha descrit que tractaments amb citotòxics com l'H_20_2 o el CDDP poden activar senescència no només a traves de p53 sinó també a través de p38MAPK [3, 137]. Recentment s´ha descrit que

p38MAPK pot regular p21 independentment de p53 incrementant l'estabilització del seu mRNA a través de HuR [101]. Per comprovar si la senescència induïda per RSK4 depèn de la via de p38MAPK es va sobreexpressar RSK4 en HDFs en els quals es mantenia inhibida aquesta via amb l'inhibidor SB203580, tal i com indicaven altres estudis [44, 90], i es va observar que aquesta inhibició no era suficient per evitar la senescència. També s'ha descrit que el tractament de cèl·lules amb NAC inhibeix l'estrès oxidatiu i bloqueja l'increment de p21 [91]. En el cas de la senescència induïda per RSK4 el tractament amb NAC tampoc era suficient per evitar la senescència i, tot i que p21 incrementava menys en cèl·lules tractades que en cèl·lules sense tractar, encara s'observava un increment en l'expressió de p21 com a conseqüència de la sobreexpressió d'RSK4. Així doncs, sembla que RSK4 podria ser un mediador de la senescència induïda per H_20_2 i CDDP, ja que en el present estudi s'ha observat com tractaments amb aquests citotòxics provoquen un increment en l'expressió d'*RSK4*, però la senescència induïda per la seva sobreexpressió sembla no ser deguda a que es generi dany en el DNA. A més, en el present estudi s´ha observat que RSK4 pot induir senescència de forma independent de p53, p16 i p38MAPK, el que suggereix que les cèl·lules presenten mecanismes de resposta alternatius que permeten la regulació de la senescència fins i tot en presència de certes mutacions.

Tot i que *RSK4* és encara molt desconegut, tots els treballs realitzats semblen indicar que és un gen supressor tumoral. En aquest treball es proposa que la inhibició d'RSK4 confereix una sèrie d'avantatges proliferatius que resulten en resistència a certs tractaments inductors d'apoptosi així com en una major capacitat per evitar la senescència tant replicativa com induïda per activació d'oncogens.

6.6 Importància de l'estudi d'RSK4 en càncer

Moltes de les controvèrsies observades sobre la regulació de la senescència són degudes a les diferències que s'ha establert que existeixen entre models cel·lulars murins i models cel·lulars humans [6]. S'ha observat que mentre que a models murins ARF i p53 són necessaris tant per la inducció de la senescència replicativa com per la senescència induïda per RAS, a humans sembla més important la via de p16/RB [121]. A més a més, pel que fa a l'activació de p53, ARF

seria el principal activador de p53 en ratolins, mentre que en humans és més important l'activació de p53 a través de DDR [138]. També s'ha descrit que tot i que p53 és molt important en models cel·lulars murins en senescència replicativa cal tenir en compte que aquestes cèl·lules en cultiu entren en senescència després de pocs passes malgrat tenir telòmers funcionals i expressió de telomerasa. Això és degut a que aquestes cèl·lules són molt sensibles a l'estrès oxidatiu que causa el manteniment en cultiu, i quan són cultivades a una tensió fisiològica d'oxigen, els fibroblats murins poden proliferar indefinidament [21]. Per tant, la senescència en models murins i humans presenta diferències que s'han de tenir en compte a l'hora d'extrapolar resultats.

Tot i aquestes complexitats dels mecanismes d'activació de la senescència, sembla que existeix un punt en comú entre ells i és que tots els senyals convergeixen en l'activació de p53 i/o RB a través de múltiples proteïnes (ATM, p38, p16, ARF, etc.). La simple activació de p53 i RB, però, no és suficient per induir senescència (per exemple, p53 i RB són activats en cèl·lules quiescents). Com ja s´ha comentat, sembla que la diferència entre la inducció d'una aturada del cicle cel·lular reversible o irreversible pot estar regulada per la durada del senyal i la seva intensitat, ja que seria necessari que aquest sobrepassés un llindar que requeriria la col·laboració de múltiples proteïnes.

Fins al moment *RSK4* s'ha proposat com un gen que participa en la regulació de la diferenciació cel·lular i en el control de la invasió en cèl·lules de carcinoma de mama. En aquest treball es presenta una nova funció d'RSK4 com a regulador de la senescència. Aquesta via de senyalització mediada per RSK4 depèn fonamentalment de p21 i RB, que serien els encarregats d'induir i mantenir l'aturada de la proliferació cel·lular, tot i que no podem descartar que altres efectors d'RSK4 juguin un paper important en aquesta resposta cel·lular.

En aquest estudi hem observat que RSK4 por induir senescència tant en models cel·lulars normals com en models de carcinoma de còlon, independentment de l'estatus de p53 i de p16. Fins fa uns anys, es creia que les cèl·lules neoplàsiques transformades no podien activar senescència. Avui dia però, es pot forçar la inducció de senescència en línies cel·lulars a través de diferents manipulacions genètiques i de factors epigenètics, incloent quimioteràpics d'ús convencional en càncer, radiació i agents diferenciants [56]. Sota dosis equitòxiques, els agents que interactuen amb el DNA (com CDDP o doxorubicina)

indueixen una resposta de senescència molt més forta que els agents que bloquegen el microtúbuls (com taxol o vincristina) [139]. Com s´ha descrit en aquest estudi la inhibició d'RSK4 genera resistència a tractaments amb CDDP pel que seria interessant determinar si els nivells d'expressió d'RSK4 poden predir la resposta cel·lular a un cert tractament.

En els darrers anys la inducció de senescència en cèl·lules tumorals s´ha proposat com una aproximació atractiva pel tractament del càncer. Tot i que és millor una teràpia que destrueixi les cèl·lules tumorals que una teràpia que les "aturi", la restauració de la senescència en cèl·lules tumorals pot resultar interessant sobretot en aquells casos on les cèl·lules no responen a tractaments inductors de la mort cel·lular.

Cal tenir en compte que s'ha descrit que la senescència pot generar efectes deleteris deguts al fenotip secretor, que pot afavorir no només l'envelliment sinó també el creixement i la transformació cel·lular. Falten, per tant, més estudis per determinar quines són les causes dels efectes negatius de la senescència i si es pot induir senescència evitant aquests efectes nocius.

A més a més, una de les grans incògnites és demostrar si les cèl·lules *in vivo* poden escapar de la senescència i desenvolupar tumors. Es desconeix si l'increment de la proliferació de les cèl·lules a tumors avançats és el resultat de l'expansió d'una fracció de cèl·lules que mai han sigut senescents o si ben al contrari és degut a cèl·lules que han escapat de senescència per adquisició de noves mutacions adquirides durant l'estat de senescència.

La senescència també s'ha proposat com un marcador per detectar el càncer en estadis inicials, de manera que els tumors amb un alt índex de senescència tindrien en teoria una millor prognosi. En aquest sentit és molt important l'estudi i caracterització de marcadors de senescència que permetin una fàcil i ràpida detecció del tumor, com seria la pèrdua d'RSK4. En aquest treball s´ha descrit que la inhibició d'RSK4 es produeix en fases inicials de la transformació cel·lular. És també durant les fases inicials quan es produeixen mutacions en oncogens com *KRAS* o *BRAF*. La inhibició d'RSK4 *in vitro* és suficient per evitar la senescència induïda per oncogens, pel que la inhibició d'RSK4 podria ser uns dels esdeveniments necessaris per iniciar la transformació cel·lular. En aquest sentit seria, per tant, de gran interès l'estudi i la correlació de l'expressió d'RSK4 amb

altres factors clinico-patològics, així com d'altres marcadors de senescència *in vivo* per determinar si RSK4 pot ser un factor pronòstic.

Finalment, fins al moment tots els treballs realitzats sobre RSK4 indiquen que participa en la regulació de senyals antiproliferatius i antiinvasius però es continua sense conèixer a través de quins substrats realitza aquestes funcions i a través de quins mecanismes és regulat, pel que són necessàries més investigacions. La comprensió d'aquests mecanismes regulats per RSK4 permetrien la manipulació de les vies de senyalització mediades per aquesta proteïna amb l'objectiu de dissenyar noves estratègies terapèutiques.

CONCLUSIONS

1. S'ha observat tant a nivell d'mRNA com a nivell de proteïna que RSK4 es trobava significativament *downregulat* en carcinomes de còlon i en carcinomes renals respecte al teixit normal. En fases inicials de la transformació de còlon ja s'observava una disminució significativa de l'expressió d'RSK4.

2. La sobreexpressió d'RSK4 tant en models cel·lulars normals com en models de carcinoma de còlon induïa un fenotip característic de senescència amb increment de p21, d'RB i amb activitat SA-β-gal. Aquest fenotip era independent de p53 i de p16.

3. L'expressió endògena d'RSK4 incrementava en cèl·lules en estat de senescència replicativa. També incrementava l'expressió d'RSK4 en cèl·lules de carcinoma de còlon 48 hores després de tractaments inductors de senescència amb H_2O_2 i CDDP.

4. La inhibició d'RSK4 amb shRNA retrasava la senescència replicativa en IMR90. També reprimia en part la senescència induïda pels oncogens *KRAS* i *BRAF* i conferia resistència a tractaments amb H_2O_2 i CDDP.

5. La senescència induïda per RSK4 depèn d'RB ja que la coexpressió d'RSK4 amb la proteïna adenoviral E1A en IMR90, la inhibició d'RB amb siRNA en HCT116 o la sobreexpressió d'RSK4 en una línia cel·lular amb *RB* mutat, evitaven la senescència induïda per RSK4.

6. La inhibició de p21 amb shRNA era suficient per evitar la senescència induïda per RSK4 en HDFs i en HCT116.

Amb aquests resultats proposem que RSK4 pot jugar un important paper en la regulació de la senescència i la immortalització almenys en alguns tipus cel·lulars com a còlon o a ronyó. La *downregulació* d'RSK4 en fases inicials de la tumorogènesi pot permetre a les cèl·lules la immortalització evitant la senescència després de l'acumulació d'altres alteracions genètiques com mutacions en *KRAS* o *BRAF*

BIBLIOGRAFIA

1. Hayflick, L., *The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains.* Exp Cell Res, 1965, 37: 614-36.
2. Collado, M., M.A. Blasco, and M. Serrano, *Cellular senescence in cancer and aging.* Cell, 2007, 130(2): 223-33.
3. Ben-Porath, I. and R.A. Weinberg, *The signals and pathways activating cellular senescence.* Int J Biochem Cell Biol, 2005, 37(5): 961-76.
4. Prieur, A. and D.S. Peeper, *Cellular senescence in vivo: a barrier to tumorigenesis.* Curr Opin Cell Biol, 2008, 20(2): 150-5.
5. Collado, M. and M. Serrano, *The power and the promise of oncogene-induced senescence markers.* Nat Rev Cancer, 2006, 6(6): 472-6.
6. Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna, *Cellular senescence: when bad things happen to good cells.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(9): 729-40.
7. Wada, T., et al., *MKK7 couples stress signalling to G2/M cell-cycle progression and cellular senescence.* Nat Cell Biol, 2004, 6(3): 215-26.
8. Berns, K., et al., *A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway.* Nature, 2004, 428(6981): 431-7.
9. Chen, Q.M., J. Liu, and J.B. Merrett, *Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H2O2 response of normal human fibroblasts.* Biochem J, 2000, 347(Pt 2): 543-51.
10. Tepper, C.G., M.F. Seldin, and M. Mudryj, *Fas-mediated apoptosis of proliferating, transiently growth-arrested, and senescent normal human fibroblasts.* Exp Cell Res, 2000, 260(1): 9-19.
11. Rochette, P.J. and D.E. Brash, *Progressive apoptosis resistance prior to senescence and control by the anti-apoptotic protein BCL-xL.* Mech Ageing Dev, 2008, 129(4): 207-14.
12. Jackson, J.G. and O.M. Pereira-Smith, *p53 is preferentially recruited to the promoters of growth arrest genes p21 and GADD45 during replicative senescence of normal human fibroblasts.* Cancer Res, 2006, 66(17): 8356-60.
13. Kuilman, T. and D.S. Peeper, *Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress.* Nat Rev Cancer, 2009, 9(2): 81-94.
14. Dimri, G.P., et al., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(20): 9363-7.
15. Kurz, D.J., et al., *Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells.* J Cell Sci, 2000, 113 (Pt 20): 3613-22.
16. Lee, B.Y., et al., *Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase.* Aging Cell, 2006, 5(2): 187-95.
17. Bayreuther, K., et al., *Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1988, 85(14): 5112-6.
18. Collado, M., et al., *Tumour biology: senescence in premalignant tumours.* Nature, 2005, 436(7051): 642.
19. Lowe, S.W. and C.J. Sherr, *Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles.* Curr Opin Genet Dev, 2003, 13(1): 77-83.
20. Beausejour, C.M., et al., *Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways.* Embo J, 2003, 22(16): 4212-22.
21. Campisi, J., *Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors.* Cell, 2005, 120(4): 513-22.
22. Macaluso, M., M. Montanari, and A. Giordano, *Rb family proteins as modulators of gene expression and new aspects regarding the interaction with chromatin remodeling enzymes.* Oncogene, 2006, 25(38): 5263-7.

23. Narita, M., et al., *Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence.* Cell, 2003, 113(6): 703-16.
24. Itahana, K., et al., *Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1.* Mol Cell Biol, 2003, 23(1): 389-401.
25. McConnell, B.B., et al., *Inhibitors of cyclin-dependent kinases induce features of replicative senescence in early passage human diploid fibroblasts.* Curr Biol, 1998, 8(6): 351-4.
26. Caino, M.C., J. Meshki, and M.G. Kazanietz, *Hallmarks for senescence in carcinogenesis: novel signaling players.* Apoptosis, 2009, 14(4): 392-408.
27. Smogorzewska, A. and T. de Lange, *Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells.* Embo J, 2002, 21(16): 4338-48.
28. Mallette, F.A., M.F. Gaumont-Leclerc, and G. Ferbeyre, *The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence.* Genes Dev, 2007, 21(1): 43-8.
29. d'Adda di Fagagna, F., *Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response.* Nat Rev Cancer, 2008, 8(7): 512-22.
30. Chen, Q.M., et al., *Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts.* Exp Cell Res, 2001, 265(2): 294-303.
31. Michaloglou, C., et al., *BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi.* Nature, 2005, 436(7051): 720-4.
32. Serrano, M., et al., *Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a.* Cell, 1997, 88(5): 593-602.
33. Courtois-Cox, S., et al., *A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence.* Cancer Cell, 2006, 10(6): 459-72.
34. Michaloglou, C., et al., *BRAF(E600) in benign and malignant human tumours.* Oncogene, 2008, 27(7): 877-95.
35. Sarkisian, C.J., et al., *Dose-dependent oncogene-induced senescence in vivo and its evasion during mammary tumorigenesis.* Nat Cell Biol, 2007, 9(5): 493-505.
36. Hemann, M.T. and M. Narita, *Oncogenes and senescence: breaking down in the fast lane.* Genes Dev, 2007, 21(1): 1-5.
37. Lee, A.C., et al., *Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species.* J Biol Chem, 1999, 274(12): 7936-40.
38. Wu, C., et al., *Regulation of cellular response to oncogenic and oxidative stress by Seladin-1.* Nature, 2004, 432(7017): 640-5.
39. Chen, Q.M., et al., *Molecular analysis of H2O2-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication.* Biochem J, 1998, 332 (Pt 1): 43-50.
40. Ray, S., et al., *MYC can induce DNA breaks in vivo and in vitro independent of reactive oxygen species.* Cancer Res, 2006, 66(13): 6598-605.
41. Dolado, I., et al., *p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis.* Cancer Cell, 2007, 11(2): 191-205.
42. Di Micco, R., et al., *Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication.* Nature, 2006, 444(7119): 638-42.
43. Courtois-Cox, S., S.L. Jones, and K. Cichowski, *Many roads lead to oncogene-induced senescence.* Oncogene, 2008, 27(20): 2801-9.
44. Wang, W., et al., *Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence.* Mol Cell Biol, 2002, 22(10): 3389-403.

45. Iwasa, H., J. Han, and F. Ishikawa, *Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway.* Genes Cells, 2003, 8(2): 131-44.
46. Sun, P., et al., *PRAK is essential for ras-induced senescence and tumor suppression.* Cell, 2007, 128(2): 295-308.
47. Kwong, J., et al., *p38alpha and p38gamma mediate oncogenic ras-induced senescence through differential mechanisms.* J Biol Chem, 2009, 284(17): 11237-46.
48. Braig, M. and C.A. Schmitt, *Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development.* Cancer Res, 2006, 66(6): 2881-4.
49. Hahn, W.C., et al., *Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation.* Mol Cell Biol, 2002, 22(7): 2111-23.
50. Trost, T.M., et al., *Premature senescence is a primary fail-safe mechanism of ERBB2-driven tumorigenesis in breast carcinoma cells.* Cancer Res, 2005, 65(3): 840-9.
51. Gorgoulis, V.G., et al., *Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions.* Nature, 2005, 434(7035): 907-13.
52. Hahn, W.C. and R.A. Weinberg, *Rules for making human tumor cells.* N Engl J Med, 2002, 347(20): 1593-603.
53. Chen, Z., et al., *Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis.* Nature, 2005, 436(7051): 725-30.
54. Mathon, N.F. and A.C. Lloyd, *Cell senescence and cancer.* Nat Rev Cancer, 2001, 1(3): 203-13.
55. Busuttil, R.A., et al., *Mutant frequencies and spectra depend on growth state and passage number in cells cultured from transgenic lacZ-plasmid reporter mice.* DNA Repair (Amst), 2006, 5(1): 52-60.
56. Roninson, I.B., *Tumor cell senescence in cancer treatment.* Cancer Res, 2003, 63(11): 2705-15.
57. Ventura, A., et al., *Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo.* Nature, 2007, 445(7128): 661-5.
58. Xue, W., et al., *Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas.* Nature, 2007, 445(7128): 656-60.
59. Chang, B.D., et al., *A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents.* Cancer Res, 1999, 59(15): 3761-7.
60. te Poele, R.H., et al., *DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo.* Cancer Res, 2002, 62(6): 1876-83.
61. Blasco, M.A., et al., *Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA.* Cell, 1997, 91(1): 25-34.
62. Krishnamurthy, J., et al., *Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging.* J Clin Invest, 2004, 114(9): 1299-307.
63. Ressler, S., et al., *p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin.* Aging Cell, 2006, 5(5): 379-89.
64. Kirkwood, T.B. and S.N. Austad, *Why do we age?* Nature, 2000, 408(6809): 233-8.
65. Lleonart, M., et al., *New p53 related genes in human tumors: significant downregulation in colon and lung carcinomas.* Oncol Rep, 2006, 16(3): 603-8.
66. Frodin, M. and S. Gammeltoft, *Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction.* Mol Cell Endocrinol, 1999, 151(1-2): 65-77.
67. Lee, K.Y., P.A. Bignone, and T.S. Ganesan, *p90 Ribosomal S6 kinases- eclectic members of the human kinome.* Signal Transduction, 2007, 7(3): 225-239.
68. Anjum, R. and J. Blenis, *The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(10): 747-58.

69. Dummler, B.A., et al., *Functional characterization of human RSK4, a new 90-kDa ribosomal S6 kinase, reveals constitutive activation in most cell types.* J Biol Chem, 2005, 280(14): 13304-14.
70. Zaru, R., et al., *The MAPK-activated kinase Rsk controls an acute Toll-like receptor signaling response in dendritic cells and is activated through two distinct pathways.* Nat Immunol, 2007, 8(11): 1227-35.
71. Ranganathan, A., et al., *The MAP kinase ERK5 binds to and phosphorylates p90 RSK.* Arch Biochem Biophys, 2006, 449(1-2): 8-16.
72. Kang, S., et al., *FGFR3 activates RSK2 to mediate hematopoietic transformation through tyrosine phosphorylation of RSK2 and activation of the MEK/ERK pathway.* Cancer Cell, 2007, 12(3): 201-14.
73. Doehn, U., et al., *p90 ribosomal S6 kinase 2 is associated with and dephosphorylated by protein phosphatase 2Cdelta.* Biochem J, 2004, 382(Pt 2): 425-31.
74. Thakur, A., et al., *Aberrant expression of X-linked genes RbAp46, Rsk4, and Cldn2 in breast cancer.* Mol Cancer Res, 2007, 5(2): 171-81.
75. Zeniou, M., et al., *Expression analysis of RSK gene family members: the RSK2 gene, mutated in Coffin-Lowry syndrome, is prominently expressed in brain structures essential for cognitive function and learning.* Hum Mol Genet, 2002, 11(23): 2929-40.
76. Hauge, C. and M. Frodin, *RSK and MSK in MAP kinase signalling.* J Cell Sci, 2006, 119(Pt 15): 3021-3.
77. Smith, J.A., et al., *Structural basis for the activity of the RSK-specific inhibitor, SL0101.* Bioorg Med Chem, 2007, 15(14): 5018-34.
78. Clark, D.E., et al., *The serine/threonine protein kinase, p90 ribosomal S6 kinase, is an important regulator of prostate cancer cell proliferation.* Cancer Res, 2005, 65(8): 3108-16.
79. Douville, E. and J. Downward, *EGF induced SOS phosphorylation in PC12 cells involves P90 RSK-2.* Oncogene, 1997, 15(4): 373-83.
80. Kim, M., et al., *Inhibition of ERK-MAP kinase signaling by RSK during Drosophila development.* Embo J, 2006, 25(13): 3056-67.
81. Dumont, J., et al., *p90Rsk is not involved in cytostatic factor arrest in mouse oocytes.* J Cell Biol, 2005, 169(2): 227-31.
82. Dufresne, S.D., et al., *Altered extracellular signal-regulated kinase signaling and glycogen metabolism in skeletal muscle from p90 ribosomal S6 kinase 2 knockout mice.* Mol Cell Biol, 2001, 21(1): 81-7.
83. Poirier, R., et al., *Deletion of the Coffin-Lowry syndrome gene Rsk2 in mice is associated with impaired spatial learning and reduced control of exploratory behavior.* Behav Genet, 2007, 37(1): 31-50.
84. Trivier, E., et al., *Mutations in the kinase Rsk-2 associated with Coffin-Lowry syndrome.* Nature, 1996, 384(6609): 567-70.
85. Yntema, H.G., et al., *A novel ribosomal S6-kinase (RSK4; RPS6KA6) is commonly deleted in patients with complex X-linked mental retardation.* Genomics, 1999, 62(3): 332-43.
86. Myers, A.P., et al., *Characterization of mouse Rsk4 as an inhibitor of fibroblast growth factor-RAS-extracellular signal-regulated kinase signaling.* Mol Cell Biol, 2004, 24(10): 4255-66.
87. Niehof, M. and J. Borlak, *RSK4 and PAK5 are novel candidate genes in diabetic rat kidney and brain.* Mol Pharmacol, 2005, 67(3): 604-11.

88. Thakur, A., et al., *Anti-invasive and antimetastatic activities of ribosomal protein S6 kinase 4 in breast cancer cells.* Clin Cancer Res, 2008, 14(14): 4427-36.
89. Thakur, A., et al., *The role of X-linked genes in breast cancer.* Breast Cancer Res Treat, 2005, 93(2): 135-43.
90. Bihani, T., et al., *Differential oncogenic Ras signaling and senescence in tumor cells.* Cell Cycle, 2004, 3(9): 1201-7.
91. Probin, V., Y. Wang, and D. Zhou, *Busulfan-induced senescence is dependent on ROS production upstream of the MAPK pathway.* Free Radic Biol Med, 2007, 42(12): 1858-65.
92. Liu, D.W., S.T. Chen, and H.P. Liu, *Choice of endogenous control for gene expression in nonsmall cell lung cancer.* Eur Respir J, 2005, 26(6): 1002-8.
93. Myohanen, S.K., S.B. Baylin, and J.G. Herman, *Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4A alleles in neoplasia.* Cancer Res, 1998, 58(4): 591-3.
94. Ferrara, L., et al., *Recovery of cell cycle delay following targeted gene repair by oligonucleotides.* DNA Repair (Amst), 2007, 6(10): 1529-35.
95. Quinlan, M.P., et al., *Activated Kras, but not Hras or Nras, may initiate tumors of endodermal origin via stem cell expansion.* Mol Cell Biol, 2008, 28(8): 2659-74.
96. Doolittle, B.R., et al., *Detection of the mutated K-Ras biomarker in colorectal carcinoma.* Exp Mol Pathol, 2001, 70(3): 289-301.
97. Deng, Q., et al., *High intensity ras signaling induces premature senescence by activating p38 pathway in primary human fibroblasts.* J Biol Chem, 2004, 279(2): 1050-9.
98. Zhu, J., et al., *Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf.* Genes Dev, 1998, 12(19): 2997-3007.
99. Esposito, F., et al., *Redox control of signal transduction, gene expression and cellular senescence.* Neurochem Res, 2004, 29(3): 617-28.
100. Torres, M., *Mitogen-activated protein kinase pathways in redox signaling.* Front Biosci, 2003, 8: d369-91.
101. Lafarga, V., et al., *p38 Mitogen-activated protein kinase- and HuR-dependent stabilization of p21(Cip1) mRNA mediates the G(1)/S checkpoint.* Mol Cell Biol, 2009, 29(16): 4341-51.
102. Vogelstein, B., et al., *Genetic alterations during colorectal-tumor development.* N Engl J Med, 1988, 319(9): 525-32.
103. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer.* Cell, 2000, 100(1): 57-70.
104. Kohn, M., et al., *Expression pattern of the Rsk2, Rsk4 and Pdk1 genes during murine embryogenesis.* Gene Expr Patterns, 2003, 3(2): 173-7.
105. Alcorta, D.A., et al., *Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(24): 13742-7.
106. Ben-Porath, I. and R.A. Weinberg, *When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence.* J Clin Invest, 2004, 113(1): 8-13.
107. Zdanov, S., et al., *Identification of p38MAPK-dependent genes with changed transcript abundance in H2O2-induced premature senescence of IMR-90 hTERT human fibroblasts.* FEBS Lett, 2006, 580(27): 6455-63.
108. Yin, C., et al., *Differentiation therapy of hepatocellular carcinoma in mice with recombinant adenovirus carrying hepatocyte nuclear factor-4alpha gene.* Hepatology, 2008, 48(5): 1528-39.
109. Felsher, D.W., et al., *Overexpression of MYC causes p53-dependent G2 arrest of normal fibroblasts.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(19): 10544-8.

110. Robinson, K., et al., *c-Myc accelerates S-Phase and requires WRN to avoid replication stress.* PLoS One, 2009, 4(6): e5951.
111. Bringold, F. and M. Serrano, *Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence.* Exp Gerontol, 2000, 35(3): 317-29.
112. Itahana, K., G. Dimri, and J. Campisi, *Regulation of cellular senescence by p53.* Eur J Biochem, 2001, 268(10): 2784-91.
113. Wei, W., et al., *Loss of retinoblastoma but not p16 function allows bypass of replicative senescence in human fibroblasts.* EMBO Rep, 2003, 4(11): 1061-6.
114. Wei, W., R.M. Hemmer, and J.M. Sedivy, *Role of p14(ARF) in replicative and induced senescence of human fibroblasts.* Mol Cell Biol, 2001, 21(20): 6748-57.
115. Malumbres, M. and M. Barbacid, *RAS oncogenes: the first 30 years.* Nat Rev Cancer, 2003, 3(6): 459-65.
116. Garnett, M.J. and R. Marais, *Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene.* Cancer Cell, 2004, 6(4): 313-9.
117. Davies, H., et al., *Mutations of the BRAF gene in human cancer.* Nature, 2002, 417(6892): 949-54.
118. Brookes, S., et al., *INK4a-deficient human diploid fibroblasts are resistant to RAS-induced senescence.* Embo J, 2002, 21(12): 2936-45.
119. Huot, T.J., et al., *Biallelic mutations in p16(INK4a) confer resistance to Ras- and Ets-induced senescence in human diploid fibroblasts.* Mol Cell Biol, 2002, 22(23): 8135-43.
120. Wei, W., et al., *Abolition of cyclin-dependent kinase inhibitor p16Ink4a and p21Cip1/Waf1 functions permits Ras-induced anchorage-independent growth in telomerase-immortalized human fibroblasts.* Mol Cell Biol, 2003, 23(8): 2859-70.
121. Benanti, J.A. and D.A. Galloway, *Normal human fibroblasts are resistant to RAS-induced senescence.* Mol Cell Biol, 2004, 24(7): 2842-52.
122. Johnson, L., et al., *K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras.* Genes Dev, 1997, 11(19): 2468-81.
123. Koera, K., et al., *K-ras is essential for the development of the mouse embryo.* Oncogene, 1997, 15(10): 1151-9.
124. Umanoff, H., et al., *The murine N-ras gene is not essential for growth and development.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(5): 1709-13.
125. Denoyelle, C., et al., *Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway.* Nat Cell Biol, 2006, 8(10): 1053-63.
126. Bragado, P., et al., *Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38alpha MAPK activation through ROS generation.* Apoptosis, 2007, 12(9): 1733-42.
127. Dannenberg, J.H., et al., *Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G(1) control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions.* Genes Dev, 2000, 14(23): 3051-64.
128. Sage, J., et al., *Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G(1) control and immortalization.* Genes Dev, 2000, 14(23): 3037-50.
129. DeGregori, J., *The Rb network.* J Cell Sci, 2004, 117(Pt 16): 3411-3.
130. Lozano, G. and G.P. Zambetti, *What have animal models taught us about the p53 pathway?* J Pathol, 2005, 205(2): 206-20.
131. el-Deiry, W.S., et al., *WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression.* Cell, 1993, 75(4): 817-25.
132. Gartel, A.L. and A.L. Tyner, *Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene.* Exp Cell Res, 1999, 246(2): 280-9.
133. Gartel, A.L., et al., *Sp1 and Sp3 activate p21 (WAF1/CIP1) gene transcription in the Caco-2 colon adenocarcinoma cell line.* Oncogene, 2000, 19(45): 5182-8.

134. Lin, A.W., et al., *Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling.* Genes Dev, 1998, 12(19): 3008-19.
135. Wajapeyee, N. and K. Somasundaram, *Cell cycle arrest and apoptosis induction by activator protein 2alpha (AP-2alpha) and the role of p53 and p21WAF1/CIP1 in AP-2alpha-mediated growth inhibition.* J Biol Chem, 2003, 278(52): 52093-101.
136. Dimri, G.P., *What has senescence got to do with cancer?* Cancer Cell, 2005, 7(6): 505-12.
137. Herbig, U. and J.M. Sedivy, *Regulation of growth arrest in senescence: telomere damage is not the end of the story.* Mech Ageing Dev, 2006, 127(1): 16-24.
138. Evan, G.I. and F. d'Adda di Fagagna, *Cellular senescence: hot or what?* Curr Opin Genet Dev, 2009, 19(1): 25-31.
139. Carnero, A., *Cellular senescence as a target in cancer control.* Current cancer therapy reviews, 2007, 3: 7-15.

Pàgines web consultades:

www.cellsignal.com

www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene

www.sanger.ac.uk

www.geneatlas.org

ANNEX

Els resultats d'aquest treball formen part dels següents articles:

Laura López, Gemma Armengol, Berta Pons, Elisabet Argelaguet, Matilde Lleonart, Javier Hernández, Inés de Torres, Santiago Ramon y Cajal. *Regulation of replicative and stress-induced senescence by RSK4, which is downregulated in human tumors.* Clin Cancer Res. 2009 Jul 15;15(14):4546-53.

Laura López, Gemma Armengol, Santiago Ramon y Cajal. *RSK4 as a therapeutic target in tumour suppression.* En revisió a Expert Opinion On Therapeutic Targets. Manuscript ID EOTT-2009-0151.

Regulation of Replicative and Stress-Induced Senescence by RSK4, which is Down-regulated in Human Tumors

Laura López-Vicente,[1,2] Gemma Armengol,[1,3] Berta Pons,[1] Laura Coch,[1] Elisabet Argelaguet,[1] Matilde Lleonart,[1] Javier Hernández-Losa,[1] Inés de Torres,[1] and Santiago Ramon y Cajal[1]

Abstract

Purpose: The control of senescence and its biochemical pathways is a crucial factor for understanding cell transformation. In a large RNA interference screen, the *RSK4* gene was found to be related to p53-dependent arrest. The purpose of the present study was to investigate the potential role of *RSK4* as a tumor suppressor gene.

Experimental Design: RSK4 expression was determined by quantitative real-time PCR and immunoblot in 30 colon and 20 renal carcinomas, and in 7 colon adenomas. Two HCT116 colon carcinoma cell lines (p53 wt and p53 null), IMR90 human fibroblasts, and E1A-expressing IMR90 cells were infected with RSK4 cDNA and/or shRNA. RSK4 expression levels were analyzed in HCT116 p53 wt or p53 null and IMR90 after senescence induction by quantitative real-time PCR and Western blot.

Results: The *RSK4* gene was down-regulated in 27 of 30 colon carcinomas ($P < 0.001$), 16 of 20 renal cell carcinomas ($P < 0.01$), and 6 of 7 colon adenomas ($P < 0.01$). *In vitro* overexpression of RSK4 induced cell arrest and senescence features in normal fibroblasts and malignant colon carcinoma cell lines. Interestingly, in these cell lines RSK4 mRNA levels were increased both in replicative and stress-induced senescence. Moreover, IMR90 partially immortalized by RSK4 shRNA and HCT116 with this short hairpin RNA were more resistant to cisplatin treatment. Finally, cells expressing E1A or Rb short interfering RNA were resistant to RSK4-mediated senescence.

Conclusion: These results support the concept that *RSK4* may be an important tumor suppressor gene by modulating senescence induction and contributing to cell proliferation control in colon carcinogenesis and renal cell carcinomas.

Cellular senescence can be defined as an irreversible arrest of cell proliferation. It is activated in response to various types of stress, including oxidative stress (e.g. hydrogen peroxide treatment), oncogene activities, DNA damage, and treatment with DNA-damaging agents (e.g. doxorubicin or cisplatin), among others. This is called accelerated or stress-induced senescence. Moreover, senescence can occur as a result of telomere shortening after multiple cell divisions, a process known as replicative senescence (1, 2). Once cells enter senescence, they stop growing and develop dramatic morphologic changes, such as a flat, enlarged morphology, as well as metabolic changes (3–7).

Two main pathways are reported to be involved in senescence, $p16^{INK4a}$/Rb and $p19^{ARF}$/p53, which are considered to be the main activators of senescence (7, 8). P16 activates Rb by inhibiting CycD/Cdk4,6. P19 activates p53 by inhibiting MDM2; p53 can be also activated by phosphorylation done by the ATM/ATR and/or Chk1/Chk2 proteins. P53 and Rb can be connected through p21, activated by p53, which, in turn, can activate Rb by inhibiting CycE/Cdk2. Once Rb is activated, it is able to shut down transcription of the E2F target genes, inducing cell growth arrest. In addition, it seems that p53 can activate senescence in human cells independently of Rb (8, 9). Whether both these senescence pathways or just one of them is necessary for inducing senescence remains a matter of controversy (10–16).

It has been shown that normal cells in culture can undergo oncogene-induced senescence in response to overexpression of the *RAS* oncogene (3, 17, 18) or its effectors, including activated mutants of *RAF*, *MEK*, and *BRAF* (8, 15, 19) acting as tumor suppressor events by preventing aberrant cell growth (20). Moreover, other oncogenes, such as *cyclin E*, *STAT5*, and *CDC6*, have been shown to induce senescence through a DNA damage response (see ref. 19 for review). Recent reports have established that oncogene-induced senescence occurs during the early stages of tumorigenesis (19, 21–23). It has

Authors' Affiliations: [1]Department of Pathology, Vall d'Hebron University Hospital, and [2]Department of Biochemistry and Molecular Biology, and [3]Unit of Biological Anthropology, Faculty of Biosciences, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

Received 12/6/08; revised 4/1/09; accepted 4/1/09; published OnlineFirst 7/7/09.

Grant support: Fondo de Investigaciones Sanitarias (Ref. 05/0818), Fundació Marató TV3 (Ref. 052710), Redes temáticas de Investigación Cooperativa en Salud (Ref. RD06/0020/0104), and Generalitat de Catalunya (Ref. 2005SGR00144). L. López was a recipient of a fellowship from Institut de Recerca Vall d'Hebron.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (http://clincancerres.aacrjournals.org/).

Requests for reprints: Santiago Ramon y Cajal, Department of Pathology, Vall d'Hebron University Hospital, Pg Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. Phone: 34932744569; Fax: 011-34-93-274-6818; E-mail: sramon@vhebron.net.

©2009 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-3159

Translational Relevance

Bypassing senescence is one of the basic initial requirements in malignant cellular transformation. Research on the cellular pathways implicated in the early phases of transformation of many solid tumors has identified several genes whose loss of function is associated with cellular immortalization or delayed induction of senescence. One of these is the *RSK4* gene, which, as described in this article, is down-regulated in a high percentage of renal and colon carcinomas and benign adenomas. The study of pathways that counteract senescence may be of clinical value to detect the early stages of cellular transformation. Moreover, senescence and apoptosis are two important cellular response mechanisms against oxidizing agents and treatment with DNA-damaging agents. Thus, the study of pathways that modulate senescence can provide a basis for the development of more effective therapeutic protocols that achieve a greater decrease in tumor cell viability.

been suggested that premalignant neoplastic lesions are rich in senescent tumor cells, restricting the growth of these lesions, whereas in most malignant tumors the majority of cells are proliferating (24, 25). Therefore, clinical use of senescence markers could be useful for detecting cancer at premalignant stages, thereby helping in the diagnosis and prognosis (19, 24).

In a large RNA interference (RNAi) screen, Berns et al. (26) identified five new modulators of p53-dependent proliferation arrest in human cells, raising the possibility that these genes are tumor suppressor genes. One of them was *RPS6KA6* [ribosomal S6 kinase 4 (*RSK4*)]. RSK4 belongs to the RSK family [90-KDa ribosomal S6 kinase (p90RSK)], which, along with mitogen- and stress-activated protein kinase, constitutes a family of protein kinases that mediate signal transduction downstream of the mitogen-activated protein kinase cascades (27–29). RSK4 is activated in cells under serum-starved conditions for unknown reasons and has very low expression levels, detectable in colon, kidney, heart, cerebellum, and skeletal muscle (28, 30, 31). The biological function of RSK4 is still poorly understood. An expression screen with mouse mRNA in *Xenopus laevis* embryos showed that RSK4 can disrupt mesoderm formation induced by the RAS-ERK pathway and was therefore proposed as an inhibitor of growth factor signal transduction (32). Depletion of RSK4 bypassed p53-dependent G_1 cell cycle arrest and suppressed mRNA expression of cyclin-dependent kinase inhibitor $p21^{cip1}$ (26). Recently, it has been described that overexpression of RSK4 resulted in reduced colony formation in soft agar and suppressed invasive and migratory activities of the breast carcinoma cell line MDA-MB-231 both *in vitro* and *in vivo* (33). Together, these studies suggest that RSK4 is distinct from RSK1-3 and seems to have growth inhibitory function.

In a previous article, we reported that RSK4 mRNA was down-regulated in colon carcinomas. In the present study, we analyzed a larger series of colon carcinomas as well as renal cell carcinomas, and again observed significant down-regulation, which was already present in colon adenomas. Based on the idea that RSK4 down-regulation could be an early step in cell immortalization in cancer, we studied the effects of RSK4 in several cell lines. We observed that RSK4 overexpression is able to induce a senescence-like phenotype in normal and tumor cells in culture, regardless of p53 and p16 status. Moreover, its levels are increased in cells undergoing replicative senescence and stress-induced senescence; after blocking RSK4 mRNA with short hairpin RNA (shRNA), IMR90 cells became resistant to replicative senescence and more resistant to H_2O_2 and cisplatin treatment. The colon carcinoma cell line HCT116 also became resistant to cisplatin treatment. This converts this protein into a potentially crucial factor for controlling senescence in some human cells.

Materials and Methods

Patients. Normal tissue and tumor tissue from 30 patients with colon carcinoma, and 20 patients with renal carcinoma were randomly chosen from the tumor bank at the Pathology Department of Vall d'Hebron Hospital (Barcelona, Spain). Adenoma tissue samples from seven patients with colon carcinoma were also available. Fifteen of the carcinoma samples have been previously described (31). Biopsied samples were quick-frozen and stored at -80°C immediately after surgery. All tumors were histologically examined to confirm the diagnosis of carcinoma. All the procedures used in the study were approved by the Ethics Committee of Vall d'Hebron Hospital.

RNA extraction and quantitative RT-PCR. Total RNA was isolated from normal and tumor tissue with the RNeasy Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. Random primers and SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) were used to carry out cDNA synthesis from 1.5 μg of total RNA. RSK4 expression was detected using the Taqman Gene Expression Assay (Hs00179523_m1; Applied Biosystems). An ABI PRISM 7000 instrument (Applied Biosystems) was used to do the relative quantification analysis, and data were analyzed with the 7000 Sequence Detection Software, v.1.2.3 (Applied Biosystems). The PCR cycling program consisted of denaturing at 95°C for 10 min and 40 cycles at 95°C for 15 s, and annealing and elongation at 60°C for 1 min. The reactions were done in triplicate.

Previously, a Taqman Human Endogenous Control Plate (Applied Biosystems) was done to determine which endogenous controls showed less variation between normal and tumoral tissue. POLR2A (Hs00172187_m1; Applied Biosystems) was chosen for colon samples and PPIA (4326316E; Applied Biosystems) for renal samples. Target and reference genes showed similar, nearly 100% amplification efficiencies (data not shown). Therefore, the ΔΔCT method was appropriate for relative gene expression analysis.

Statistical analysis. Statistical comparisons were made with the Statistical Package for Social Science, version 11.5 (SPSS, Inc.). The Wilcoxon test was used to compare differences between normal and tumor tissue.

Plasmid construction. pLPCX-RSK4 was constructed from pCDNA3.1-Higro-RSK4, kindly donated by R. Bernards (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Netherlands); pCR2.1 (Invitrogen); and pLPCX (Clontech), a retroviral vector with puromycin resistance. First, the *RSK4* gene was PCR-amplified from pCDNA3.1-Hygro-RSK4 using T7 and BGH primers (Invitrogen). The PCR product was ligated to the linear vector pCR2.1 to obtain pCR2.1-RSK4. Then, pLPCX-RSK4 was constructed by cloning the respective cDNA fragment from pCR2.1-RSK4 into the pLPCX vector. pLPCX-GFP, kindly donated by S. Gutkind (NIH), was used as a control for virus infections.

The inducible retroviral vector RT-E1A-ER was kindly provided by A. Serrano (Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain). E1A was induced with 1 μmol/L of tamoxifen treatment.

Before the shRSK4-pLKO.1 construction, three different validated short interfering RNAs (siRNA) for RSK4 were tested (AM16708A; Ambion) following the manufacturer's instructions; siRNA 945 (GGUAAAUGGUCUUAAAAUG) was selected as it presented the highest RSK4 down-regulation (data not shown). Using this siRNA sequence, the shRNA for RSK4 GATCCGGTAAATGGTCTTAAAATGTTCAAGAGACATTTTAAGACCATTTACCTTTTTTACGCGTG was designed and cloned into the

pLKO.1 puro vector (Sigma-Aldrich) and a Non-Target shRNA vector (Sigma-Aldrich) was used as control for lentivirus infections.

Cell culture. The following cell lines were used in this study: human primary fibroblasts, IMR90 (American Type Culture Collection), and colon carcinoma cells HCT116 p53 wt and HCT116 p53 null (kindly donated by B. Vogelstein, The John Hopkins Oncology Center, Baltimore, MD). All cells were grown in DMEM supplemented with 10% FCS and antibiotics. HCT116 p53 wt and HCT116 p53 null cell lines were maintained in culture supplemented with 200 μg/mL of gentamicin.

The IMR90-Tx-E1A cell line was generated by retrovirus infection with the E1A tamoxifen induction vector RT-E1A-ER.

Retrovirus-based gene transduction. Retrovirus-based gene transduction was carried out using a packaging cell line (GP-293; Clontech) according to the manufacturer's instructions. After two consecutive virus infections, cells were selected with puromycin (0.7 μg/mL for HCT116, 1.25 μg/mL for IMR90) for 3 d to eliminate uninfected cells.

Lentivirus-based shRNA transduction. Lentivirus-based transduction was carried out using a packaging cell line, HEK293T, by cotransfection of pCMV-dR8.91 dvpr (kindly donated by D. Trono, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne, Switzerland) and VSV-G (Clontech). After two consecutive virus infections, cells were selected with puromycin for 3 d.

siRNA transfection. Validated siRNA for Rb (s523; Ambion), Silencer negative control siRNA (AM4611; Ambion), and the positive transfection control Silencer Cy3-labeled GADPH siRNA (AM4623; Ambion) were transfected into HCT116 p53 wt cells, previously transduced with RSK4 or GFP. After selection, 7.5×10^4 cells were seeded in a 12-well plate and 15 nmol/L of each siRNA were transfected using Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen), following the manufacturer's instructions.

Growth curves. Two days after selection, cells were counted and seeded in duplicate every 4 d. Population doublings (PD) were determined by the following formula: $PD = \text{Log}(N_f/N_i)/\text{Log}2$, where N_f is the number of cells counted and N_i is the number of cells seeded. Cumulative PD numbers (PDL) represent the sum of PDs from previous passages. For HCT116 p53 wt and HEK293T, 1.8×10^5 cells were seeded. For HCT116 p53 null and MDA-MB-468, 2.5×10^5 cells were seeded. Each curve was done at least twice with similar results, and each time point was determined in duplicate.

For cisplatin (CDDP) and hydrogen peroxide (H_2O_2) resistance growth curves, cells were plated into 24-well plates (2×10^4 cells for IMR90; 1.5×10^4 cells for HCT116) and treated for 2 h with H_2O_2 or for 3 d with CDDP with the concentrations indicated below. After treatment, fresh medium was added for 3 d. Then cells were washed with PBS, fixed in 10% formalin, and rinsed with distilled water. Cells were stained with 0.1% crystal violet (Sigma) for 30 min, rinsed thoroughly, and dried. Cell-associated dye was extracted with 2 mL 10% acetic acid and the optical density was determined at 590 nm. A value of 100% was assigned to untreated control cultures. All points within each experiment were determined in duplicate, and each experiment was done at least twice.

Replicative senescence induction and treatment with oxidative and DNA-damaging agents. Replicative senescence in IMR90 was attained after 40 passages in culture. Oxidative and DNA-damage stress induction in HCT116 cell line was carried out by 2 h of treatment with H_2O_2 500 μmol/L or 6 h of treatment with 20 μg/mL of CDDP.

Analysis of senescence. Senescence-associated β-galactosidase (SA-β-gal) activity, a biomarker of cellular senescence (34), was determined with the Senescence β-galactosidase kit (Cell Signaling), following the manufacturer's instructions.

Western blot. Lysates were obtained from both cell lines and tissues. Tissues were ground and sonicated in a lysis buffer (HEPES 50 mmol/L, pH 7.5; NaCl 150 mmol/L; 1% Triton X; EDTA 1 mmol/L; 10% glycerol) in the presence of protease and phosphatase inhibitors, whereas subconfluent cells were lysed in the same buffer for 10 min at 4°C. After the lysates were cleared by centrifugation, protein concentrations were determined using the Bradford assay (Bio-Rad Protein Assay). About 50 to 100 μg of protein were denaturated and resolved on SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Bio-Rad). The primary antibodies used were anti-RSK4 (sc-17178; Santa Cruz Biotechnologies; diluted 1:100), anti-β-actin (CP01; Calbiochem; diluted 1:7,000), anti-$p21^{WAF1}$ (MS-891; Neomarkers; diluted 1:500), anti-p16 (DB018; Deltabiolabs; diluted 1:200), anti-Rb (G3-245; BD Biosciences; diluted 1:200), and anti-p53 clone DO-7 (M7001; Dako; diluted 1:500). The secondary antibodies used were donkey antigoat IgG-HRP (sc-2020; Santa Cruz Biotechnologies; diluted 1:5,000), sheep antimouse IgG-HRP (NA9310; Amersham Pharma-Biotech; diluted 1:3,000), and donkey antirabbit IgG-HRP (NA9340; Amersham Pharma-Biotech; diluted 1:2,000). Bound antibodies were visualized with an enhanced chemiluminescence detection kit (Amersham Pharma-Biotech).

Results

RSK4 is down-regulated in human tumors. RSK4 was found to be down-regulated in colon and renal tumor tissues as compared with normal colon and renal tissues, respectively (Fig. 1A). Down-regulation was detected by quantitative real-time PCR (Wilcoxon test; $P < 0.001$ and $P < 0.01$, respectively), and confirmed by Western blot in a subset of tumors (Fig. 1B). RSK4 mRNA showed a 5-fold mean reduction in colon carcinomas and 10-fold reduction in renal carcinomas. Among the 30 patients with colon carcinoma studied and the 20 with renal carcinoma, RSK4 was down-regulated in 27 and 16 patients, respectively. No clinicopathologic correlation was observed in patients with mRNA down-regulation. The following parameters were considered: tumor size, infiltration, Duke stage, presence of lymph node metastases, survival, and tumor-node-metastasis staging.

In addition, we investigated at what stage of colon tumor progression RSK4 down-regulation started. We analyzed RSK4 mRNA expression in seven normal, seven adenoma, and seven carcinoma samples (Fig. 1C). Down-regulation was significant ($P < 0.01$) in adenomas, but expression differed between adenoma and carcinoma ($P < 0.05$). Moreover, we were able to analyze RSK4 expression in normal, adenoma, and carcinoma samples from the same individual for four patients, and progressive down-regulation of RSK4 was observed in all of them (Fig. 1D).

Transduction of RSK4 induces cell growth arrest in colon carcinoma cell lines. To determine the effect of RSK4 in tumor cell lines, we chose two colon carcinoma cell lines (HCT116 p53 wt and HCT116 p53 null) with no endogenous expression of RSK4. The *RSK4* gene was transduced into these cell lines via retroviral infection. We observed dramatic morphologic changes characteristic of senescent (35) cells together with an increment in SA-β-gal activity 6 days postselection (Fig. 2A). This effect occurred in both the HCT116 p53 wt and p53 null cell lines. Growth curve analysis showed that cells expressing RSK4 did not accumulate in culture (Supplementary Fig. S1). Western blot analysis confirmed that these cells expressed RSK4, whereas cells infected with the *GFP* gene showed no RSK4 expression (Fig. 2B). To determine which of the senescence pathways ($p16^{INK4a}$/Rb or $p19^{ARF}$/p53) was activated, we analyzed the expression of senescence-related proteins, such as p21, p53, and Rb (Fig. 2B). Induction of the senescence-like phenotype by RSK4 correlated with an increase in p21 expression levels. However, this induction was independent of p53 because it was observed in both p53 wt and p53 null cells.

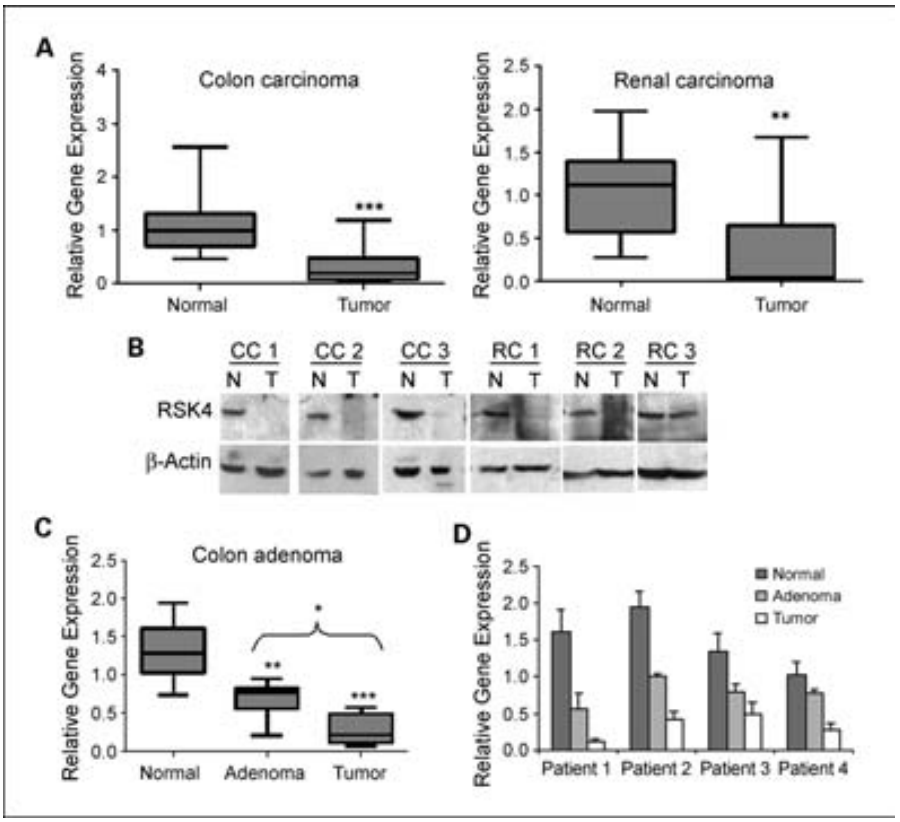


Fig. 1. RSK4 is down-regulated in adenomas and human tumors. *A,* levels of RSK4 mRNA were analyzed in colon and renal carcinomas by quantitative real-time PCR. RSK4 mRNA was measured in normal and tumor tissue from 30 patients with colon carcinoma and 20 patients with renal carcinoma. *B,* protein lysates were obtained from normal (N) and tumor (T) tissue of six patients with colon carcinoma (CC) or renal carcinoma (RC), and RSK4 was analyzed by immunoblot. *C,* seven adenomas were analyzed for RSK4 mRNA expression in comparison with seven normal colon tissues and seven colon carcinomas by quantitative real-time PCR. *D,* levels of RSK4 mRNA were analyzed by quantitative real-time PCR during tumor progression in normal, adenoma, and carcinoma tissues of four patients. Error bars, SD between triplicates; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. Data from normal (N), adenoma, and tumor (T) tissue of each patient were measured in triplicate.

P53 expression was not affected in HCT116 p53 wt by RSK4 overexpression. Both cell types showed an increment of the underphosphorylated form of Rb. Expression of p16 was not analyzed because HCT116 cells are characterized by mutations in this gene (a frameshift mutation in one allele and a promoter methylation in the other allele; ref. 36).

Transduction of RSK4 induces cell growth arrest in IMR90 cells. To assay the effect of RSK4 in normal cells, the *RSK4*

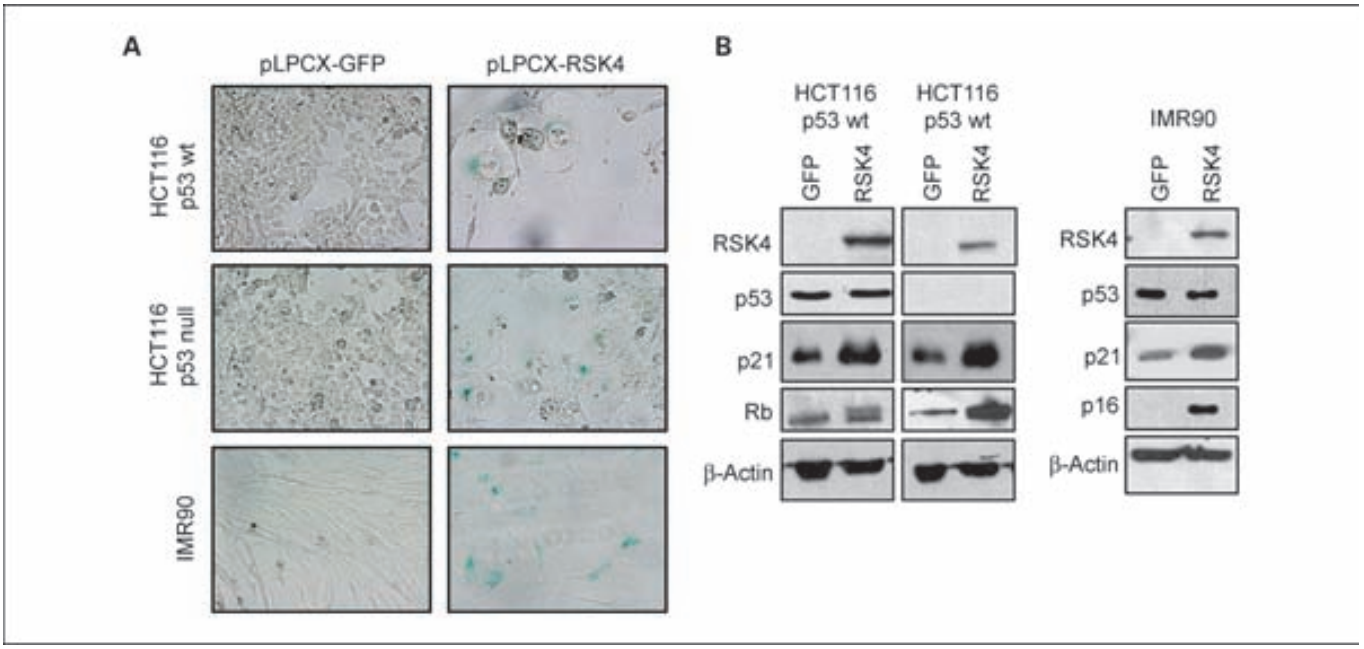


Fig. 2. RSK4 induces senescence in the HCT116 colon carcinoma cell line and in the IMR90 normal fibroblast cell line. *A,* HCT116 p53 wt, HCT116 p53 null cells, and IMR90 cells were infected with retrovirus encoding GFP or RSK4. After selection, cells were seeded at the same density, and cell morphology and SA-β-gal activity were analyzed 6 d postselection. Images are at same magnification (20×). *B,* four days after selection, whole cell lysate for each cell line was assessed by immunoblotting for levels of RSK4, p53, p21, and Rb for HCT116 cell lines, and RSK4, p53, p21, and p16 for IMR90 cells. Equal loading was verified by β-actin.

gene was transduced in IMR90 primary human diploid fibroblasts. Six days after selection, RSK4 expression induced morphologic changes and cells began to display a flat and enlarged morphology similar to the senescence morphology described previously for this cell line (3). Cells expressing RSK4 also had SA-β-gal activity (Fig. 2A), and senescence-associated heterochromatin foci (SAHF) formation was observed with 4′, 6-diamidino-2-phenylindole staining (data not shown). These effects indicated that RSK4 induced a senescence-like phenotype. The senescence-related proteins p53, p21, and p16 were analyzed and an increment of p21 and p16 was observed (Fig. 2B).

RSK4 is up-regulated after induction of senescence in a normal fibroblast cell line. To investigate whether RSK4 is a senescence modulator, we tested RSK4 expression levels in IMR90 after inducing senescence by cumulative passages. Cells stopped proliferating, acquired the enlarged, flattened morphology typical of senescent cells, and were positive for SA-β-gal staining (data not shown). The senescent cells showed increased RSK4 expression on quantitative real-time PCR and Western blot (Fig. 3A).

RSK4 is up-regulated after treatment with H_2O_2 or CDDP in colon carcinoma cell lines. After observing the up-regulation of RSK4 in normal senescent cells, we wanted to determine whether this occurs in tumor cell lines and whether the event is p53-dependent. Interestingly, the same up-regulation effect was observed in carcinoma cell lines (HCT116 p53 wt and p53 null) after H_2O_2 or CDDP treatment (Fig. 3B). Moreover, the effect was p53-independent, as both cell lines showed the same results.

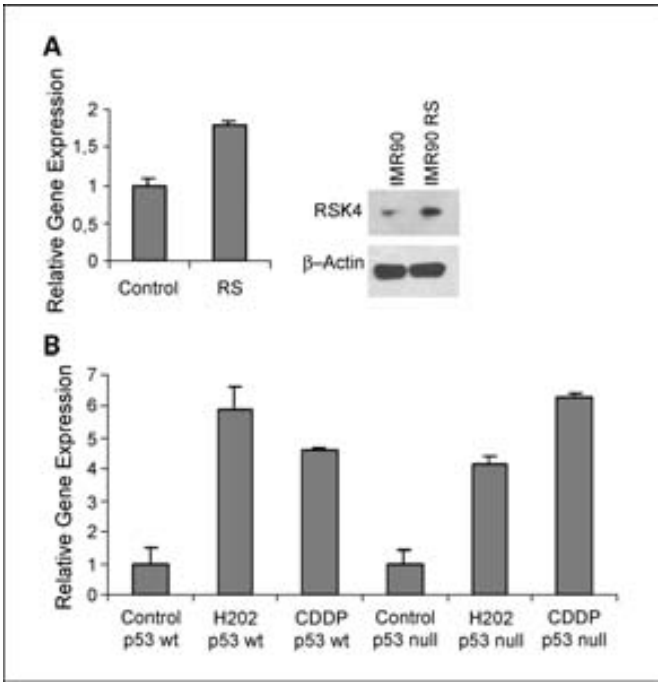


Fig. 3. Increment of RSK4 expression after senescence induction in IMR90 and HCT116 cell lines. *A,* RSK4 expression was analyzed by quantitative real-time PCR and Western blot in control IMR90 (corresponding to passage 15) and IMR90 in replicative senescence (RS; corresponding to passage 40). *B,* RSK4 expression was analyzed by quantitative real-time PCR in HCT116 p53 wt and p53 null cells 48 h after treatment with 500 μmol/L of H_2O_2 for 2 h or 20 μg/mL of CDDP for 6 h. Time of analysis was selected according to previously obtained results (Supplementary Fig. S2). HCT116 p53 wt and p53 null without treatment were used as controls. Error bars, SD of triplicates. Each experiment was done at least twice.

RSK4 inhibition induces senescence resistance. Because RSK4 was increased in replicative senescence and stress-induced senescence, we then investigated whether RSK4 inhibition could confer resistance to senescence induced through different pathways. To assess this objective we infected normal IMR90 cells and colon carcinoma cells with shRSK4-pLKO.1 or shNonTarget-pLKO.1 vector and checked the RSK4 inhibition by quantitative real-time PCR (Supplementary Fig. S3). We observed that IMR90 cells with inhibited RSK4 became immortalized and did not show senescence features at passage 40 of lifespan, whereas control IMR90 cells (IMR90-shNonTarget) were senescent (Fig. 4A). Moreover, IMR90 transduced with shRSK4-pLKO vector were more resistant to H_2O_2 and CDDP treatment (Fig. 4B and C) and showed a smaller number of SA-β-gal-positive cells (data not shown). Interestingly, HCT116 cells lacking RSK4 expression showed a clear increase in survival after treatment with DNA-damaging agents (Fig. 4D), but not with H_2O_2 (data not shown).

Mode of action of RSK4-induced senescence-like phenotype. As shown in Fig. 2, RSK4 overexpression induced cell growth arrest in normal IMR90 fibroblasts and in malignant carcinoma cells, regardless of p53, p16, and K-Ras status (*K-RAS* is mutated in HCT116 cells). RSK4 overexpression was associated with an increase of p21 protein in all these cell lines, and with an increase of p16 in IMR90 cells. Note that HCT116 carcinoma cells do not express p16. Thus, these data seemed to suggest that RSK4-mediated senescence is not related to p53 or p16, and that other downstream factors may be involved. E1A efficiently negates the cell cycle arrest induced by oncogenic RAS (3). To test whether E1A can bypass the senescence-like phenotype induced by RSK4 overexpression, the *RSK4* gene was transduced into the IMR90-Tx-E1A cell line, and E1A was then induced with tamoxifen. E1A was able to immortalize fibroblasts expressing RSK4 at the same level as cells with GFP (Fig. 5A). Western blot analysis confirmed expression of RSK4 and E1A in these cells (Fig. 5B). To test whether Rb could be a central target for mediating *RSK4* senescence, we transduced *RSK4* or *GFP* in HCT116 p53 wt. After selection, cells were transfected with Silencer Cy3-labeled GADPH siRNA, Silencer negative control siRNA, or Rb siRNA. Three days after transfection, SA-β-gal activity was determined. Silencer Cy3-labeled GAPDH siRNA was used for monitoring delivery of siRNAs (Fig. 6). Cells encoding RSK4 and Rb siRNA resumed growth, whereas cells harboring RSK4 and NonTarget siRNA were arrested and were positive for SA-β-gal staining. RSK4 and Rb expression was checked by Western blot (Supplementary Fig. S4).

Discussion

RSK4, a member of the RSK family, is involved or expressed in specific clinical and physiologic situations, such as embryonal development, p53-dependent cell cycle arrest, and even in starving conditions (26, 28, 37). The observation that RSK4 becomes activated in situations of starving or a lack of growth factors is intriguing, as it suggests that RSK4 autophosphorylation could be a way to maintain cell life under conditions of stress.

In a preliminary study of the five genes associated with p53 senescence identified by Berns et al. (26), we found that RSK4

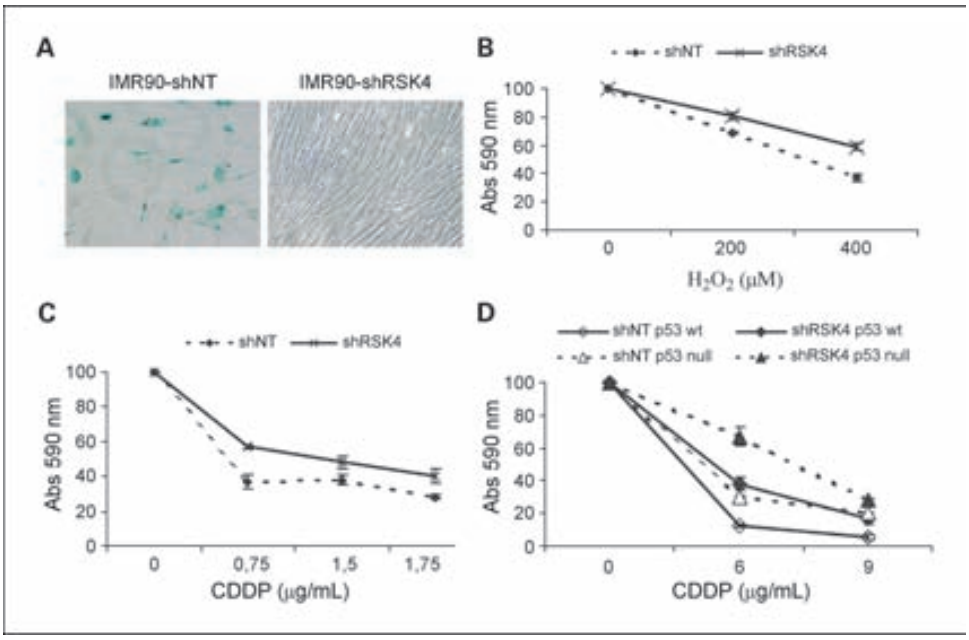


Fig. 4. Inhibition of RSK4 confers resistance to senescence in IMR90 and HCT116 cell lines. *A,* IMR90 cells were infected with lentivirus encoding shRSK4-pLKO.1 vector (shRSK4) or the shNonTarget-pLKO.1 vector (shNT). Six passages after selection (corresponding to passage 31 of lifespan), IMR90-shNT and IMR90-shRSK4 cells were seeded at the same density and cultivated for 72 h before SA-β-galactosidase analysis. Images are at same magnification (20×). *B* and *C,* representative growth curves corresponding to IMR90-shNT and IMR90-shRSK4 in the presence of increasing concentrations of H_2O_2 (*B*) or CDDP (*C*). Error bars, SD of duplicates. Each experiment was done at least twice. *D,* representative growth curves corresponding to HCT116 p53 wt and HCT116 p53 null infected with the shRSK4 vector or the shNT, in the presence of increasing concentrations of CDDP. Error bars, SD of duplicates. Each experiment was done at least twice.

was significantly down-regulated in colon carcinomas as compared with normal tissue (31). In the present study, we have extended the number of colon tumors, and investigated RSK4 levels in renal cell tumors and colon adenomas, focusing on its role in *in vitro* senescence. Interestingly, RSK4 mRNA levels decreased significantly in colon adenomas with respect to normal mucosa. These results seem to indicate that decreased RSK4 expression may be an early event in colon tumorigenesis. As supported by *in vitro* studies with knocked-down RSK4 cells, which became immortalized, these results suggest that an

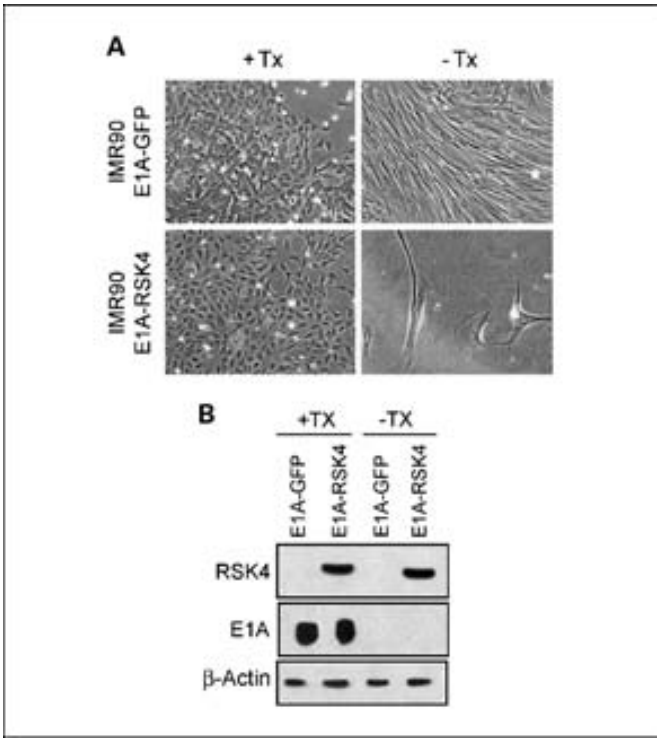


Fig. 5. RSK4 does not induce senescence in IMR90 cells expressing E1A. *A,* the IMR90-Tx-E1A cell line was infected with retrovirus encoding for RSK4 or GFP. After selection, cells were maintained in culture with 1 μmol/L of tamoxifen (+Tx) or vehicle (-Tx). *B,* whole protein lysates of these cells were obtained after 2 wk of tamoxifen or vehicle treatment, and RSK4 and E1A expression was checked by immunoblot.

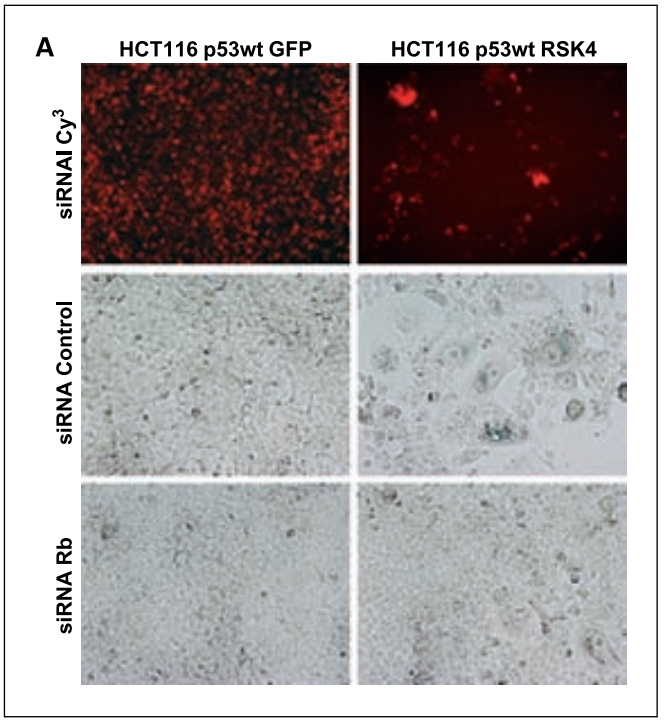


Fig. 6. RSK4 does not induce senescence when Rb is knocked down. *A,* the HCT116 p53 cell line was transduced with *GFP* or *RSK4*. After selection, cells were seeded and transfected with Silencer Cy3-labeled GADPH siRNA, a Silencer negative control siRNA, or a validated Rb siRNA. Each transfection was done twice. Three days after transfection, cell morphology and SA-β-galactosidase activity were analyzed, and siRNA delivery was determined monitoring the Silencer Cy3-labeled GADPH siRNA. Images are at same magnification (20×).

absence of RSK4 expression could be relevant in benign adenomas harboring a large population of immortalized cells.

Abrogation of cellular senescence has been shown to be the first step in creating an *in vitro* model of human cancer (12, 19, 38). Moreover, in colon carcinomas where the number of senescent cells is supposed to be extremely low, the level of RSK4 was also minimal. Therefore, we propose RSK4 as a putative novel tumor suppressor and that its absence results in failure of senescence induction, which, combined with other alterations, possibly leads to tumor formation. It is well known that in colon adenomas, cells acquire cell growth autonomy by different oncogenic targets that can be activated, including growth factor receptors, *K-RAS* mutations, and others. In this context, RSK4 down-regulation could prevent oncogenic-induced senescence. Moreover, similar results were obtained in renal cell carcinomas, which showed a highly significant decrease of RSK4 mRNA levels with respect to normal kidney cells. It is noteworthy that colon and kidney are among the tissues that show the highest RSK4 expression (28, 30, 31). Hence, in these tissues, RSK4 down-regulation could be indicative of early steps in cell transformation.

Based on this evidence, we decided to work with normal and tumor cell lines to determine whether RSK4 can induce senescence when overexpressed, and to investigate which pathways might be involved. Interestingly, RSK4 overexpression induced marked cell growth arrest and a senescence-like phenotype in colon carcinoma cell lines (HCT116 p53 wt and p53 null) and in primary human fibroblasts (IMR90) confirming *in vitro* that high levels of RSK4 can stop immortalization, acting as a tumor suppressor mechanism.

Going further, we investigated whether cells in replicative or stress-induced senescence had high levels of RSK4 mRNA. In IMR90 normal fibroblasts exposed to replicative senescence induction, we observed an increase of RSK4, with levels up to 70% higher. In the HCT116 colon carcinoma cell line exposed to H_2O_2 treatment, RSK4 mRNA levels increased up to 6-fold in HCT116 wt p53 cells and 4-fold in HCT116 p53 null cells. After treatment with CDDP, the increase was 4.5-fold and 6.5-fold in HCT116 wt and null cell lines, respectively. Various experiments have indicated that inactivation of p53 generally delays the onset of senescence (5, 11, 13, 39, 40). This could explain why the two types of cells collected on the same day progressed to senescence at different rates and showed different RSK4 levels. It has been suggested that oxidative stress due to H_2O_2 treatment induces senescence through p53-p21-Rb (38), although other studies have indicated that p16 can also be activated, possibly through the action of p38-MAPK protein (1, 7). Taking into account these data, we hypothesized that RSK4 could be a mediator of stress-induced and replicative senescence. To investigate this idea, we introduced RSK4 shRNA into HCT116 p53 wt and null cells. After treatment with CDDP, cells lacking RSK4 became more resistant, whereas no clear differences were noted after H_2O_2 treatment, although we had observed that RSK4 expression increased in H_2O_2-induced senescence. These data may indicate that RSK4 is necessary but not indispensable to achieve growth arrest in this stress situation. Interestingly, p53 wt and null HCT116 cells showed a similar increase in resistance to CDDP when RSK4 was knocked out. These results could indicate that apoptosis was not the only factor involved in the cell number decrease. When RSK4 was blocked in IMR90 fibroblasts, the cells became more resistant to both H_2O_2 and CDDP, indicating that different cell types may utilize different pathways in the presence of stress signals.

Due to the fact that a senescence-like phenotype was induced in cells with *p53* null mutations, *K-RAS* mutations, and lack of *p16*, among other genetic alterations, it seems that RSK4-induced senescence is not dependent on these specific factors. Because it is well known that the p53 and Rb proteins play the most critical roles in induction of senescence (7), we thought that Rb might be the key factor in this context. We studied the effect of RSK4 on E1A-expressing IMR90 cells and found that they were resistant to RSK4-induced senescence. Moreover, senescence was not induced when Rb was knocked down in HCT116 p53 wt, suggesting that Rb could be an essential pathway to drive cells to senescence via activation of RSK4.

These results raise the point that RSK4 may be an important mediator of several pathways driving cells to senescence. The biochemical pathways controlled or regulated by RSK4 are not well defined or understood. As occurs in p16 and p21, RSK4 levels increase in replicative senescence. In our preliminary approach, we observed that RSK4 overexpression induced cell growth arrest regardless of p53 status in malignant cells carrying many oncogenic alterations, including *K-RAS* mutations and lack of p16. Senescence-like phenotypes were not observed after RSK4 overexpression in cells carrying adenovirus E1A.

Taking our clinical data and data from basic studies together, we propose that RSK4 may play a relevant role in senescence and immortalization control in at least some cell types that display a relevant mRNA baseline RSK4 level, such as normal colon and kidney cells. RSK4 mRNA down-regulation at the early stages of tumorigenesis could enable cells to become immortalized and avoid senescence after accumulation of genetic alterations, such as *K-RAS* mutations. Recent work on RSK4 in the MDA-MB-431 breast cancer cell line has indicated that RSK4 expression exerts a tumor suppressor effect by anti-invasive and antimetastatic activities through regulation of claudin-2 (33). Our results agree with the findings of this study and support the concept of *RSK4* as a new tumor suppressor gene whose function deserves to be completely explored, with investigation into the biochemical pathways and factors through which RSK4 can mediate senescence.

We propose that several, still poorly understood biochemical pathways can control senescence in addition to the p53 and p16 proteins. Factors such as RSK4, with as yet not completely defined biochemical substrates, may act in a way similar to the so-called funnel factors (41) and drive senescence signals, becoming a potential hallmark factor in senescence-mediating pathways.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We are grateful to the tumor banks of Hospital Vall d'Hebron and Xarxa del Banc de Tumors de Catalunya for providing the tumor samples, and thank A. Carnero, R. Sánchez-Prieto, and M. Serrano for their careful reading and suggestions, and C. Cavallo for English editing.

References

1. Herbig U, Sedivy JM. Regulation of growth arrest in senescence: telomere damage is not the end of the story. Mech Ageing Dev 2006;127:16–24.

2. Shay JW, Roninson IB. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. Oncogene 2004; 23:2919–33.

3. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. Cell 1997;88:593–602.

4. Courtois-Cox S, Genther Williams SM, Reczek EE, et al. A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. Cancer Cell 2006;10: 459–72.

5. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. Nat Rev Mol Cell Biol 2007;8:729–40.

6. Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. Cell 2007;130:223–33.

7. Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. Int J Biochem Cell Biol 2005;37:961–76.

8. Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. Cell 2005;120:513–22.

9. Ben-Porath I, Weinberg RA. When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. J Clin Invest 2004;113:8–13.

10. Brown JP, Wei W, Sedivy JM. Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. Science 1997;277:831–4.

11. Bond JA, Wyllie FS, Wynford-Thomas D. Escape from senescence in human diploid fibroblasts induced directly by mutant p53. Oncogene 1994;9:1885–9.

12. Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, et al. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. EMBO J 2003;22:4212–22.

13. Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. Nature 2005;436: 725–30.

14. Xue W, Zender L, Miething C, et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. Nature 2007;445:656–60.

15. Lin AW, Barradas M, Stone JC, van Aelst L, Serrano M, Lowe SW. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. Genes Dev 1998;12: 3008–19.

16. Sherr CJ, Bertwistle D, W DENB, et al. p53-Dependent and -independent functions of the Arf tumor suppressor. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 2005;70:129–37.

17. Bihani T, Chicas A, Lo CP, Lin AW. Dissecting the senescence-like program in tumor cells activated by Ras signaling. J Biol Chem 2007;282:2666–75.

18. Di Micco R, Fumagalli M, d'Adda di Fagagna F. Breaking news: high-speed race ends in arrest - how oncogenes induce senescence. Trends Cell Biol 2007; 17:529–36.

19. Prieur A, Peeper DS. Cellular senescence *in vivo*: a barrier to tumorigenesis. Curr Opin Cell Biol 2008;20: 150–5.

20. Bartkova J, Rezaei N, Liontos M, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. Nature 2006;444:633–7.

21. Trost TM, Lausch EU, Fees SA, et al. Premature senescence is a primary fail-safe mechanism of ERBB2-driven tumorigenesis in breast carcinoma cells. Cancer Res 2005;65:840–9.

22. Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, et al. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. Nature 2005;436:720–4.

23. Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. Nature 2005;434:907–13.

24. Collado M, Gil J, Efeyan A, et al. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. Nature 2005; 436:642.

25. Braig M, Lee S, Loddenkemper C, et al. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. Nature 2005;436:660–5.

26. Berns K, Hijmans EM, Mullenders J, et al. A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. Nature 2004;428: 431–7.

27. Frodin M, Gammeltoft S. Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. Mol Cell Endocrinol 1999;151:65–77.

28. Dummler BA, Hauge C, Silber J, et al. Functional characterization of human RSK4, a new 90-kDa ribosomal S6 kinase, reveals constitutive activation in most cell types. J Biol Chem 2005;280:13304–14.

29. Hauge C, Frodin M. RSK and MSK in MAP kinase signalling. J Cell Sci 2006;119:3021–3.

30. Niehof M, Borlak J. RSK4 and PAK5 are novel candidate genes in diabetic rat kidney and brain. Mol Pharmacol 2005;67:604–11.

31. Lleonart M, Vidal F, Gallardo D, et al. New p53 related genes in human tumors: significant downregulation in colon and lung carcinomas. Oncol Rep 2006; 16:603–8.

32. Myers AP, Corson LB, Rossant J, Baker JC. Characterization of mouse Rsk4 as an inhibitor of fibroblast growth factor-RAS-extracellular signal-regulated kinase signaling. Mol Cell Biol 2004;24:4255–66.

33. Thakur A, Sun Y, Bollig A, et al. Anti-invasive and antimetastatic activities of ribosomal protein S6 kinase 4 in breast cancer cells. Clin Cancer Res 2008; 14:4427–36.

34. Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated β-galactosidase assay. Methods Mol Biol 2007;371:21–31.

35. Chang BD, Xuan Y, Broude EV, et al. Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. Oncogene 1999;18:4808–18.

36. Myohanen SK, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4A alleles in neoplasia. Cancer Res 1998;58:591–3.

37. Kohn M, Hameister H, Vogel M, Kehrer-Sawatzki H. Expression pattern of the Rsk2, Rsk4 and Pdk1 genes during murine embryogenesis. Gene Expr Patterns 2003;3:173–7.

38. Dimri GP. What has senescence got to do with cancer? Cancer Cell 2005;7:505–12.

39. Shay JW, Pereira-Smith OM, Wright WE. A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. Exp Cell Res 1991;196:33–9.

40. Itahana K, Dimri G, Campisi J. Regulation of cellular senescence by p53. Eur J Biochem 2001;268: 2784–91.

41. Armengol G, Rojo F, Castellvi J, et al. 4E-binding protein 1: a key molecular funnel factor in human cancer with clinical implications. Cancer Res 2007;67: 7551–5.

RSK4 as a therapeutic target in tumour suppression

Laura López-Vicente[a,b], Gemma Armengol[a,c], Santiago Ramon y Cajal[a]*

[a] Department of Pathology, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain
[b]Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biosciences, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain
[c]Unit of Biological Anthropology, Faculty of Biosciences, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

*Corresponding author:
Santiago Ramon y Cajal
Dept. Pathology, Vall d'Hebron University Hospital
Pg.Vall d'Hebron 119-129, 08035-Barcelona, Spain
e-mail: sramon@vhebron.net

Financial support: This work was supported by grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias (Ref. 05/0818), Redes temáticas de Investigación Cooperativa en Salud (Ref. RD06/0020/0104 and RD060020/1020), and Generalitat de Catalunya (Ref. 2005SGR00144). L. López was a recipient of a fellowship from Institut de Recerca Vall d'Hebron.

ABSTRACT

Since RSK4 was discovered in 1999, it has been subject of few studies, but in the last five years the studies realized propose RSK4 as a putative tumor suppressor gene. In this article, we review all the knowledge we have about RSK4 and discuss whether it is a good candidate for new therapeutic approaches for cancer.

In 2004, RSK4 was described as a mediator of p53 growth arrest induction. Since then, some studies have identified RSK4 as an inhibitor of the Ras-MAPKs pathway, as an inhibitior of metastasis and, importantly, as an inductor of cellular senescence. In human tumors RSK4 has been found downregulated in carcinomas; and at least in colon and mama, RSK4 is downregulated even in early stages of tumorogenesis. All these data suggest that RSK4 is an unusual RSKs, since other RSKs are involved in cell cycle proliferation and survival.

In this review the importance of RSK4 in cancer is discussed, as well as its role as a putative cancer therapeutic target.

RSK4 can be used as a marker of senescence, and its expression can be indicative of tumoral stage. Moreover, its antiproliferative functions, especially induction of senescence, make it a possible therapeutic target in tumor suppression.

Ribosomal S6 kinase 4 (RSK4) has been described as a factor with a putative tumor suppressor activity. It seems to be very relevant in the complex pathways involved in senescence, which is a crucial physiological event that malignant cells have to overcome to get immortalized. Induction of senescence by overexpression of RSK4 may open new avenues in clinical treatment of malignant tumors.

RPS6KAs

RSK4 belongs to the 90KDa ribosomal S6 kinase (RPS6KA) family. RPS6KA is a family of Ser/Thr kinases that lie downstream of the Ras-MAPKs cascade. This family consists of four ribosomal S6 kinase (RSK) isoforms (RSK1-4) and two structurally related homologes or mitogen/stress activated protein kinases (MSK1-2). The RSKs share 72-82% of aminoacid identity with each other and 39-42% with MSKs (61% between them) [1].

RPS6KA family is unique among Ser/Thr kinases in that it contains two functional kinase domains. The N-terminal kinase domain (NTK) shares homology with the AGC kinase family (PKA, PKG, PKC) and is responsible for phosphorylation of substrates. The C-terminal kinase domain (CTK) shares homology with Calcium/Calmodulin dependent kinases (CaMKs) and its only known function is activation of NTK [2, 3]. The NTK and CTK are connected by a conserved linker region, which contains a hidrophobic motif. The C-terminal end of the protein contains an extracellular signal-regulated kinase-1 and –2 (ERK1/2) docking site called D domain [4, 5].

The RSK isoforms are directly activated by ERK1/2 in response to growth factors, many polipeptidic hormones, neurotransmitters, chemokines and other stimuli. In contrast, the MSKs are activated by both ERK1/2 and p38 MAPKs pathways [1, 5, 6].

RSKs activation

RSKs are activated following mitogen stimulation through the Ras- MAPKs pathway. RAS is activated principally by tyrosin kinase receptors (TKR) like epithelial growth factor receptor (EGRF). The current model of RSKs activation (using RSK1 nomenclature) is that following mitogen stimulations, RAS initiates the signal pathway that activates ERK1/2. These MAPKs phosphorylate Thr 573 in the CTK and Thr 359 in the linker region of RSK. This activates the CTK that phosphorylates the hidrophobic motif creating a docking site for PDK1 that phosphorylates Ser 221 in the NTK [7], leading to the full activation of RSK. The NTK can phosphorylate the C terminal domain modulating ERK1/2 interactions [3, 8] (Figure 1).

Inactive RSKs are localized into the citoplasm and nucleus along with its upstream activator ERK1/2. Upon activation, a fraction of the activated ERKs and RSKs enter the nucleus and this translocation correlates with the activation of immediate-early genes [9, 10]. The precise mechanism of nuclear translocation of RSKs from the cytosol to the nucleus is not well understood and only RSK3 has a clear nuclear localization signal (NLS) [11]. Among the four isoforms, RSK4 was initially described as a predominantly cytosolic protein [8]. Nevertheless, nuclear expression of RSK4 has been described in breast carcinoma cell lines as well as in some breast tumours [12]. Although RSK4 has a bipartite nuclear localization signal, it doesn't appear to be functional since nuclear RSK4 signal in transfected cells is not affected by mutations in this sequence [8].

RSK1-3 mRNAs are expressed ubiquitously in every human tissue tested; however, tissue-specific variations suggest that the RSKs might have specific roles [13]. On the other hand, RSK4 has very low expression levels. In public databases the number of human RSK4 expressed sequence tags (ESTs) is extraordinary low (27 ESTs) compared to RSK1 (384 ESTs), RSK2 (225 ESTs) or RSK3 (314 ESTS) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). In an study performed with immunobloting of lysates from adult mouse tissues RSK4 expression was observed in skeletal muscle, brain, heart, cerebellum and kidney, whereas it was not detectable in liver, lung, pancreas and adipose tissue [8]. In humans, RSK4 mRNA has been detected in liver [14], colon, lung, prostate, kidney [15, 16] and breast [12], although its levels have not been compared to other RSKs.

Cellular processes regulated by RSKs

Since the discovery of RSKs 20 years ago, this family has been related to many different functions, ranging from apoptosis and transcripcional regulation of immediate early genes to the maintenance of the cell cycle and growth [6]. RSKs are distributed in different cellular compartments and might regulate proteins throughout the cell. The substrate specificity of RSKs has been determined with synthetic peptide libraries and it has been described that their substrates require a minimum consensus phosphorylation motif Arg-X-Arg-X-X-pSer/Thr [17]. This consensus sequence is also shared by other kinases such as AKT, S6K1/2 and MSKs. A number of RSK functions can be deduced from the nature of the RSKs substrates [5].

One role described for RSKs is the regulation of cellular proliferation. Some substrates that might participate in proliferation are NHE1, ER□ and MITF [3, 6]. RSK2 can also phosphorylate FOS increasing its stabilization and favoring proliferation [18].

RSKs may also promote proliferation by stimulating growth-related protein synthesis. RSK1 phosphorylates TSC2 and inactivates its tumour supressor function promoting mTOR signalling and translocation [19]. RSK also phosphorylates an important factor of the translation machinery, eIF4B enhancing protein synthesis [5, 20].

Moreover, RSKs regulate cell survival through phosphorylation and activation of the pro-apototic proteins BAD [21] and DAPK [22] or through phosphorylation and inhibition of GSK3 [23]. GSK3 inhibition stabilizes cyclin D1 and MYC, promoting cell cycle progression and surviving [23, 24].

RSKs as therapeutic targets

The RPS6KA family has been identified as a promising anti-cancer target since it plays an important role in the RAS-MAPKs signaling mediating diverse cellular processes, such us cell growth, cell motility, cell survival and cell proliferation. RAS signalling pathway is commonly activated in tumours in which growth-factor-receptor tyrosine kinases are overexpressed or amplified. The most common examples are EGFR and ERBB2. EGFR is overexpressed in more than 50% of human carcinomas and ERBB2 is amplified in around 30% of breast tumours [25]. For that reason, TKR are a good target for cancer therapy. Several strategies have been designed for its inhibition, including antibody-based targeting and small-molecules tyrosin kinase inhibitors. Nevertheless, a high percentage of human cancers present mutations downstream TKR and thereby are resistant to their inhibition. About

30% of human tumors have activating point mutations in *RAS*, most frequently in *KRAS* (about 85% of total), then *NRAS* (about 15%) and *HRAS* (less than 1%) [26]. In these tumours, the activated RAS protein contributes significantly to several aspects of the malignant phenotype, including the deregulation of tumour-cell growth, programmed cell death and invasiveness, and the ability to induce new blood-vesel formation. Moreover, some RAS effectors are also mutated, in particular BRAF is mutated in melanomas (around 70%) and colon carcinomas (arround 15%) [27].

Many experimental approaches have established RSKs as important effectors of the Ras-MAPKs pathway [6]. Since RSKs are mediators of this pathway and regulate the proliferation and survival of cells, RSKs inhibition could be a good strategy for tumour treatment, in those tumours that do not respond to classical inhibitors of the RAS-MAPKs pathway. It has been observed that SL010, a selective inhibitor of RSKs, inhibits proliferation of breast [28] and prostate [29] carcinoma cell lines. Nevertheless, specific inhibitors for each isoform of RSKs have not been developed yet. It has been suggested that RSKs could also have some antiproliferative function, for example, RSK2 can downregulate the RAS-MAPKs pathway through SOS in a negative feeback loop [30]. As we will discuss below, RSK4 has also been proposed as in inhibitor of the RAS-MAPKs pathway and poses anti-invasive and antiproliferative characteristics (discussed below), so its inhibition could have not desired effects. Further investigations are needed to elucidate the exact role of each RSK isoform, as well as the development of more specific inhibitors before the design of a new anti-tumour strategy based on RSK family.

RSK4, special characteristics

Mapping to the Xq21 region related to X-linked mental retardation, Yntema *et al*. identified in 1999 a new gene that shared a high homology to the RSKs described up to that moment (RSK1-3) [31]. Since its discovery, RSK4 has been subject of few studies, but it has been observed that although RSK4 is a member of the RSK family, it is somewhat unusual in that it present funcional and strucutral differences.

One of the differences between RSK4 and the other RSKs have been descrived above. While RSKs are highly expressed in almost every human tissue, RSK4 is also expressed ubiquitously but much lower than other RSKs (www.geneatlas.org). Dummler *et al*. [8] already realized this observation and they described that 10 times more cells were necessary to immunoprecipitate endogenous RSK4, compare to other RSKs.

Functionally, contrary to RSK1-3, endogenous RSK4 is maximally activated in serum-starved cells for reasons not entirely clear. Moreover, it does not require growth stimulation or PDK1 phosphorylation to reach a significant kinase activity. This constitutive activity of RSK4 appears to result from constitutive phosphorylation of key sites by basal ERK activity and autophosphorylation [8]. ERK is a very abundant kinase with an estimated concentration of 1–3 μM in mammalian cells [8], whereas RSK4 has very low expression, so basal ERK activity contribute to at least 30–50% of the activity of endogenous RSK4 [8].

Although most kinases are regulated in a post-transcriptional level, mainly through phosphorylation, constitutive activation of RSK4 may indicate that its regulation may be primarily at the

expression level. Regarding to this, using chromatin immunoprecipitation (ChIP) RSK4 was identified as a novel target of the transcription factor HNF4α. [14]. HNF4α plays an important role in epithelial differentiation of organs like liver, kidney, intestine and colon, and it has been proposed that this function may be regulated through RSK4 and its interaction with the RAS-MAPKs pathway [14]. Recently, it has also been described that the regulatory sequence of *RSK4* contains a c-MYC binding site, indicating that c-MYC could also regulate RSK4 expression although a biological function has not been described yet [32].

In 2004, Berns *et al.* [33] carried out a short interfering RNA (siRNA) screen to identify mediators of p53-induced growth arrest. They used primary human fibroblast cells that ectopically expressed a temperature sensitive large T antigen. At 32ºC large T antigen binds p53 and RB allowing cell proliferation but at 39ºC, large T antigen is inactivated and the cells arrest. A retroviral siRNA library, encoding 7914 genes, was used to identify genes which inhibition confers resistance to cell cicle arrest. It was observed that the knockdown of *RSK4* abolishes p53-dependent G1 cell cycle arrest induced either by conditional activation of p53 or by DNA damage, raising for the first time the possibility that *RSK4* might be a tumour-supressor-gene, since p53 is a central component of the cellular response to a variety of stress signals. P53 regulates cell cycle mainly through activation of p21, which is a member of the cyclin-dependent kinase inhibitor family (CDKIs) and regulates the cell cycle by inhibiting the phosphorylation of cyclin-CDK complexes. In this work it was also showed that RSK4 knockdown reduce p21 at both mRNA and protein levels. However, another p53 target, BAX, remained unaffected [33].

In another study, a functional screen of mouse mRNAs to identify molecules that regulate the RAS-MAPK pathway demonstrated that RSK4 injection, but not RSK1-3, disrupts the subsequent formation of mesoderm, which is induced by the RAS-MAPKs pathway [34]. Although the exact mechanism of inhibition was not resolved, the inhibitory action appeared to take place downstream of RAS, resulting in reduced phosphorylation of MEK and ERK at the activating sites. In this study, it was shown that in mouse embryos, *Rsk4* is expressed in the extraembryonic tissue, a tissue in which the regulation of Ras-MAPKs pathway is critical for proper development. Moreover, Rsk4 expression was inversely correlated with Erk expression [34]. The authors proposed that RSK4, in contrast to other RSK proteins, does not mediate, but rather inhibits the RAS-MAPKs pathway.

An interesting structural difference between RSK4 and other RSKs, that could explain some of the differences observed, is that the reported mouse and rat RSK4 sequences contain an additional N-terminal region that is not found in the other RSK family members. Since human RSK4 was originally identified by positional cloning, this suggests that human RSK4 may also contain this additional domain at its N terminus [6]. However, the function of this potentially novel domain remains to be determined.

RSK4 and cancer

Recently, two different studies have indicated that RSK4 may have anti-invasive and antiproliferative properties [16, 32]. First, it was observed that RSK4 overexpression in the breast carcinoma cell line MDA-MB-468 resulted in reduced colony formation in soft agar and RSK4-overexpressing cells also showed a significantly reduced chemotaxis against CXCL12, as well as a

significantly reduced chemoinvasion compared with control cells [32]. Moreover, RSK4 overexpressing cells showed reduced expression of CXCR4, an increased expression of CLDN2, whereas exactly the opposite effects were observed after RSK4 inhibition. Importantly, upregulation of CXCR4 on cancer cells has been related with metastasis of breast cancer in lymph nodes, lungs and bones [32], whereas CLDN2 is a transmembrane protein essential for the maintenance of tight junction strands that contribute to the maintenance of epithelial tissue integrity. Alteration in the tight junction barrier function can result in epithelial to mesenchymal transition. In the same study it was also observed *in vivo* that RSK4 overexpressing MDA-MB-468 cells injected in the mammary fat pads of SCID mice were less aggressive and tumours were significantly smaller and did not show invasive capacity. The number of metastases developed was also reduced in mice injected with RSK4-overexpressing cells.

These authors had also shown in a previous study an increased RSK4 expression in the mammary tumours of transgenic mice expressing c-myc (MMTV-c-Myc) compared with normal mammary glands or mammary tumours of TGF□ transgenic mice [35]. The authors hypothesized that the non-invasive and non-metastatic phenotype of MMTV-c-Myc mice could be due to c-Myc-induced expression of RSK4.

The second study proposed RSK4 as a mediator of senescence [16]. Senescence is, like apoptosis, a cellular mechanism activated under stress conditions that leads cells to an irreversible growth arrest limiting the proliferation of potentially damaged cells. Senescence can be classified as replicative senescence when it is activated as a consequence of telomere exhaustion, or premature senescence when it is achieved as a consequence of other stresses such as DNA damage or oncogene activation. Senescence is regulated by p53 and/or p16/RB pathways. These two pathways are connected through p21, which is principally activated by p53, and that can activate RB. Whether both these senescence pathways or just one of them is necessary for inducing senescence remains a matter of controversy [36-38].

RSK4 overexpression in normal and most malignant cell lines resulted in cells becoming senescent [16]. The senescence induction was observed even in malignant cells harboring multiple genetic alterations such as mutations of *TP53*, *KRAS*, *PIA3K*, lack of *P16* and others. Overexpression of RSK4 also induced upregulation of tumour suppressor genes like *P21* or *RB* (also observed by Thakur *et al.* [32]), senescence-associated □-galactosidase activity and senescence associated heterochromatin foci (SAHF) [16]. Moreover, Lopez-Vicente *et al.* [16] observed that RSK4 endogenous expression increased in cells subjected to senescence-inducing treatments like subcitotoxic treatment with hydrogen peroxide or with the chemotherapic drug cisplatin.

In vitro and *in vivo* studies have shown that normal cells can undergo senescence in response to overexpression of oncogenes like *RAS*, *RAF*, *MEK* and *BRAF*, acting as a tumour suppressor event by preventing aberrant cell growth [39-41]. Recent reports have established that oncogen-induced-senescence occurs during the early stages of tumorogenesis [42-44] and senescent cells are present in premalignant neoplasic lesions, restricting the growth of these lesions, whereas in most malignant tumours the majority of cells are proliferating [45, 46]. Therefore, clinical use of senescence markers could be useful for detecting cancer at premalignant stages, helping in the diagnosis and prognosis [47, 48]. It is believed that alterations in pathways regulating senescence are also an early event necessary to

allow tumour progression. Lopez-Vicente *et al.* [16] showed that lack of RSK4 in normal fibroblasts is enough for normal cells to become immortalized and overcome replicative and oncogene induced senescence. Moreover, this inhibition also confers resistance to cisplatin treatment, indicating that lack of RSK4 confers cells a proliferative advantage.

Analysis of RSK4 expression in human tumours has indicated that RSK4 is significantly downregulated in kidney and colon carcinomas at mRNA and protein level compared to normal tissue [16]. Interestingly, RSK4 mRNA levels also decrease significantly in colon adenomas with respect to normal mucosa, and in carcinomas with respect to adenomas. These results seem to indicate that decreased RSK4 expression may be an early event in colon tumorigenesis, and its expression could be indicative of the tumoral stage. Since RSK4 knockdown confers *in vitro* resistance to senescence, and disruption of senescence pathways are necessary for tumour progression, RSK4 downregulation in human tumours may be indicative of alteration in senescence pathways an therefore may be useful as a prognosis marker although more investigation is needed before approving this hypothesis. Moreover, in human breast cancer Takhur *et al.* [12] observed that RSK4 protein is strongly expressed in mammary ducts and is completely or partially lost in benign mammary lesions, although it seems to reappear in ductal carcinoma. These results also support the hypothesis that expression patterns of RSK4 could predict the predisposal to tumours to become malignant.

The inhibition of RSK4 observed in carcinomas does not seem to be due to mutations since only two mutations in *RSK4* gene have been described in 320 samples analyzed, including 32 colon, 33 kidney and 45 breast carcinomas according to Catalogue of somatic mutations in cancer (www.sanger.ac.uk). This suggests that other mechanisms may be involved in *RSK4* silencing, such as promoter methylation or gene depletion. Importantly, *RSK4* gene maps to chromosome Xq21, on a locus commonly deleted in patients with X-linked mental retardation (MRX). Deletions in Xq have also been shown in various cancer patients and many studies have reported 14% to 30% loss of Xq region in primary breast carcinomas and infiltrative ductal or lobular carcinomas [32]. The fact that *RSK4* is located on the chromosome X can also be important due to the fact that mammalians only have one active X-chromosome, so loss of heterozygosity may result in the loss of the function of an X-linked tumour suppressor gene in a single step, leading to cancer predisposition.

All these studies show that RSK4 may play a critical role in tumorogenesis. RSK4 is a ribosomal protein kinase what means that it may not only play a role in the regulation of gene expression through post-translational modifications but also through transcriptional and post-transcriptional modifications of transcription factors, coregulators and other unknown targets. How RSK4 suppresses invasion, metastasis, and proliferation, and induces senescence warrant more investigation. Importantly, understanding the pathways regulated by RSK4 may allow its manipulation to design new therapeutic strategies.

At the moment three probably related functions have been described for RSK4: i) Inhibition of the RAS-MAPKs pathway; ii) Anti-invasive and antimetastatic activity and iii) senescence induction (Figure 2). These three anti-proliferative and anti-invasive properties suggest RSK4 as a novel therapeutic target.

Expert Opinion: RSK4 as a new therapeutic target

In the last years, senescence induction in tumour cells has been proposed as a new strategy for cancer treatment especially for those tumours resistant to apoptosis. The observation that RSK4-induced senescence does not need canonical p53 or p16 proteins opens new avenues in clinical treatment of malignant tumors that frequently present mutations in these two proteins.

Regarding senescence, there are two main areas that should be developed for obtaining new data to integrate in the clinical management of cancer patients. First, it is known that many oncogenes and stress situations may induce or accelerate senescence and that the induction of senescence is an important barrier against transformation. Then, the study of genes such as *RSK4* or the substrates activated directly or indirectly by this gene, may probably allow in the future detecting early malignancies or higher risk of developing malignant tumors. In this way, one of the most promising fields in oncology is the identification of factors that are associated with tumor progression and can be detected in early steps of carcinogenesis or in asymptomatic patients. To get that goal, we need to identify specific substrates of these genes that are upregulated and may be detected by proteomic techniques.

Second, the control of senescence plays an important role in the progression of malignant cells and in the response to many antitumour agents such as chemotherapy and radiotherapy. In this sense, it is relevant to study in deep the cellular pathways activated or downregulated by RSK4 to be able to induce senescence, because they can give us new information about cellular and biochemical factors involved in controlling senescence. The study of the substrates of RSK4 can be straightforward in the study of senescence, especially if we can modulate them by specific drugs. The role of MAPK and p21, which are regulated by RSK4 even in cells lacking p53 or p16, can open new perspectives in the field of senescence.

We think that the research on factors which can favor senescence induction are going to be critical in the future about tumor prognosis and mainly about the understanding of tumor response to antitumor therapeutic agents. Moreover, its study can allow us to sensitize cells to antitumor treatment, by modulating senescence, and can be a logical and practical approach in developing new protocols in cancer treatment. In this way, it is essential to discover the main cellular routes that drive cells to senescence in malignant cells displaying multiple genetic alterations and to find factors that can be activated or downregulated by specific drugs. Since it was observed that RSK4 expression increased in tumoral cells after cisplatin treatment, and RSK4 expression seems to be related with cisplatin sensitivity, the analysis of RSK4 expression before and after cisplatin treatment could be an indicator of the tumour response to chemotherapy.

Most therapeutical approaches are based on the development of drugs or antibodies that inhibit proteins realated with proliferation. Nevertheless, in the case of RKS4 all the anticancer functions are related with its activaction. For example, RSK4 has been described as an inhibitor of RAS-MAPKs pathway and most human tumours have activating mutations in oncogenes of RAS-MAPKs pathway (like *RAS* or *BRAF*), what raises the opportunity to use RSK4 as an inhibitor of this pathway.

Even though we propose RSK4 to be a good candidate for new therapeutical approaches in cancer, we do not believe that delivery of whole genes such *RSK4* can be practical and worthwhile until better delivery *in vivo* systems are optimized. So the identification of RSK4 substrates and the identification of molecules able to activate them could be a good alternative. Until then, we believe that

the study of RSK4 could be in the direction of characterizing its potential as a prognosis marker in human tumours.

References

1. Lee KY, Bignone PA, Ganesan TS. p90 Ribosomal S6 kinases- eclectic members of the human kinome. Signal Transduction 2007;7:225-39.
2. Bjorbaek C, Zhao Y, Moller DE. Divergent functional roles for p90rsk kinase domains. J Biol Chem 1995;270:18848-52.
3. Frodin M, Gammeltoft S. Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. Mol Cell Endocrinol 1999;151:65-77.
4. Roux PP, Richards SA, Blenis J. Phosphorylation of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) regulates extracellular signal-regulated kinase docking and RSK activity. Mol Cell Biol 2003;23:4796-804.
5. Anjum R, Blenis J. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 2008;9:747-58.
6. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. Microbiol Mol Biol Rev 2004;68:320-44.
7. Jensen CJ, Buch MB, Krag TO, et al. 90-kDa ribosomal S6 kinase is phosphorylated and activated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. J Biol Chem 1999;274:27168-76.
8. Dummler BA, Hauge C, Silber J, et al. Functional characterization of human RSK4, a new 90-kDa ribosomal S6 kinase, reveals constitutive activation in most cell types. J Biol Chem 2005;280:13304-14.
9. Chen RH, Sarnecki C, Blenis J. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. Mol Cell Biol 1992;12:915-27.
10. Murphy LO, Smith S, Chen RH, et al. Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. Nat Cell Biol 2002;4:556-64.
11. Zhao Y, Bjorbaek C, Weremowicz S, et al. RSK3 encodes a novel pp90rsk isoform with a unique N-terminal sequence: growth factor-stimulated kinase function and nuclear translocation. Mol Cell Biol 1995;15:4353-63.
12. Thakur A, Rahman KW, Wu J, et al. Aberrant expression of X-linked genes RbAp46, Rsk4, and Cldn2 in breast cancer. Mol Cancer Res 2007;5:171-81.
13. Zeniou M, Ding T, Trivier E, et al. Expression analysis of RSK gene family members: the RSK2 gene, mutated in Coffin-Lowry syndrome, is prominently expressed in brain structures essential for cognitive function and learning. Hum Mol Genet 2002;11:2929-40.
14. Niehof M, Borlak J. RSK4 and PAK5 are novel candidate genes in diabetic rat kidney and brain. Mol Pharmacol 2005;67:604-11.
15. Lleonart M, Vidal F, Gallardo D, et al. New p53 related genes in human tumors: significant downregulation in colon and lung carcinomas. Oncol Rep 2006;16:603-8.

16. Lopez-Vicente L, Armengol G, Pons B, et al. Regulation of replicative and stress-induced senescence by RSK4, which is down-regulated in human tumors. Clin Cancer Res 2009;15:4546-53.
17. Leighton IA, Dalby KN, Caudwell FB, et al. Comparison of the specificities of p70 S6 kinase and MAPKAP kinase-1 identifies a relatively specific substrate for p70 S6 kinase: the N-terminal kinase domain of MAPKAP kinase-1 is essential for peptide phosphorylation. FEBS Lett 1995;375:289-93.
18. Hauge C, Frodin M. RSK and MSK in MAP kinase signalling. J Cell Sci 2006;119:3021-3.
19. Roux PP, Ballif BA, Anjum R, et al. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:13489-94.
20. Shahbazian D, Roux PP, Mieulet V, et al. The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. Embo J 2006;25:2781-91.
21. Shimamura A, Ballif BA, Richards SA, et al. Rsk1 mediates a MEK-MAP kinase cell survival signal. Curr Biol 2000;10:127-35.
22. Anjum R, Roux PP, Ballif BA, et al. The tumor suppressor DAP kinase is a target of RSK-mediated survival signaling. Curr Biol 2005;15:1762-7.
23. De Mesquita DD, Zhan Q, Crossley L, et al. p90-RSK and Akt may promote rapid phosphorylation/inactivation of glycogen synthase kinase 3 in chemoattractant-stimulated neutrophils. FEBS Lett 2001;502:84-8.
24. Sears R, Nuckolls F, Haura E, et al. Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. Genes Dev 2000;14:2501-14.
25. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. Nat Rev Cancer 2005;5:341-54.
26. Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. Nat Rev Cancer 2007;7:295-308.
27. Michaloglou C, Vredeveld LC, Mooi WJ, et al. BRAF(E600) in benign and malignant human tumours. Oncogene 2008;27:877-95.
28. Smith JA, Poteet-Smith CE, Xu Y, et al. Identification of the first specific inhibitor of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) reveals an unexpected role for RSK in cancer cell proliferation. Cancer Res 2005;65:1027-34.
29. Clark DE, Errington TM, Smith JA, et al. The serine/threonine protein kinase, p90 ribosomal S6 kinase, is an important regulator of prostate cancer cell proliferation. Cancer Res 2005;65:3108-16.
30. Douville E, Downward J. EGF induced SOS phosphorylation in PC12 cells involves P90 RSK-2. Oncogene 1997;15:373-83.
31. Yntema HG, van den Helm B, Kissing J, et al. A novel ribosomal S6-kinase (RSK4; RPS6KA6) is commonly deleted in patients with complex X-linked mental retardation. Genomics 1999;62:332-43.
32. Thakur A, Sun Y, Bollig A, et al. Anti-invasive and antimetastatic activities of ribosomal protein S6 kinase 4 in breast cancer cells. Clin Cancer Res 2008;14:4427-36.
33. Berns K, Hijmans EM, Mullenders J, et al. A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. Nature 2004;428:431-7.

34. Myers AP, Corson LB, Rossant J, et al. Characterization of mouse Rsk4 as an inhibitor of fibroblast growth factor-RAS-extracellular signal-regulated kinase signaling. Mol Cell Biol 2004;24:4255-66.
35. Thakur A, Xu H, Wang Y, et al. The role of X-linked genes in breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2005;93:135-43.
36. Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. Int J Biochem Cell Biol 2005;37:961-76.
37. Caino MC, Meshki J, Kazanietz MG. Hallmarks for senescence in carcinogenesis: novel signaling players. Apoptosis 2009;14:392-408.
38. Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. Cell 2005;120:513-22.
39. Courtois-Cox S, Jones SL, Cichowski K. Many roads lead to oncogene-induced senescence. Oncogene 2008;27:2801-9.
40. d'Adda di Fagagna F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. Nat Rev Cancer 2008;8:512-22.
41. Braig M, Schmitt CA. Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development. Cancer Res 2006;66:2881-4.
42. Trost TM, Lausch EU, Fees SA, et al. Premature senescence is a primary fail-safe mechanism of ERBB2-driven tumorigenesis in breast carcinoma cells. Cancer Res 2005;65:840-9.
43. Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, et al. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. Nature 2005;436:720-4.
44. Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. Nature 2005;434:907-13.
45. Collado M, Gil J, Efeyan A, et al. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. Nature 2005;436:642.
46. Braig M, Lee S, Loddenkemper C, et al. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. Nature 2005;436:660-5.
47. Prieur A, Peeper DS. Cellular senescence in vivo: a barrier to tumorigenesis. Curr Opin Cell Biol 2008;20:150-5.
48. Collado M, Serrano M. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. Nat Rev Cancer 2006;6:472-6.

LEGENDS TO THE FIGURES

Figure 1. Structure of RSKs. The 90 KDa ribosomal S6 kinase family is characterized by the presence of two functionally kinase domains, the N-terminal (NTK) and the C-Terminal (CTK), which are connected through a higher conserved linker region. The C-terminal end of RSKs contains an ERK docking domain called D Domain (DD). P identifies the six phophorylation sites of RSKs necessaries for its activation; the kinases responsible of each phosphorylation are indicated. The two grey boxes show the activation sites. The conserved phosphorylation sites of human RSKs are marked in bold.

Figure 2. RSK4 antitumoral functions. HNF4α can activate RSK4 expression; this activation has been related with epithelial differentiation of organs like liver, kidney, intestine and colon, possible through RSK4 function as an inhibitor of the RAS-MAPKs pathway. C-MYC can also modulate RSK4 expression. This connection between c-MYC and RSK4 has been related to the non-invasive and non-metastatic phenotype observed in tumours of MMTV-c-Myc mice. RSK4 anti-invasive and anti-metastatic function can be explained by its capacity to downregulate CXCR4 and upregulate CLDN2. Finally, it has also been described that senescence signals can induce RSK4 expression. Moreover, RSK4 overexpression can activate senescence through upregulation of p21 in a p53-independent way in normal and tumoral cells.

Figure 1

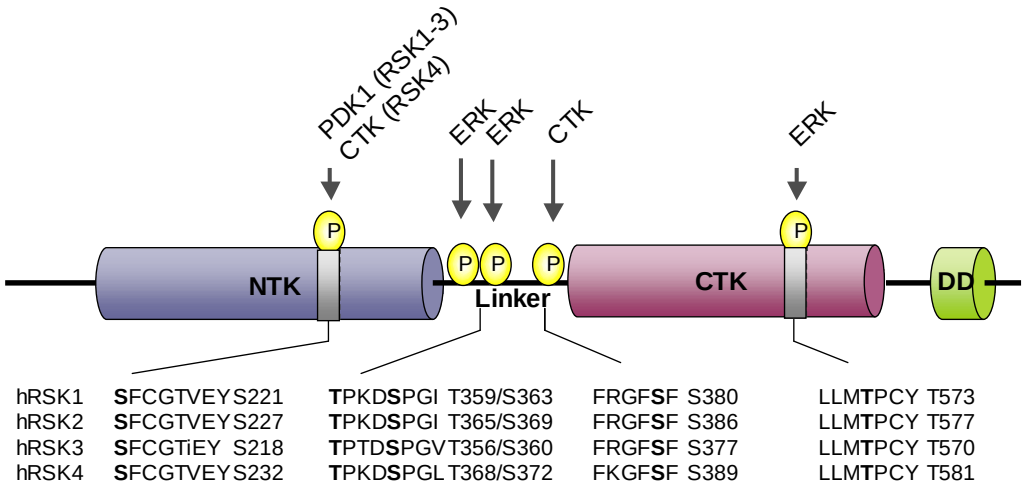
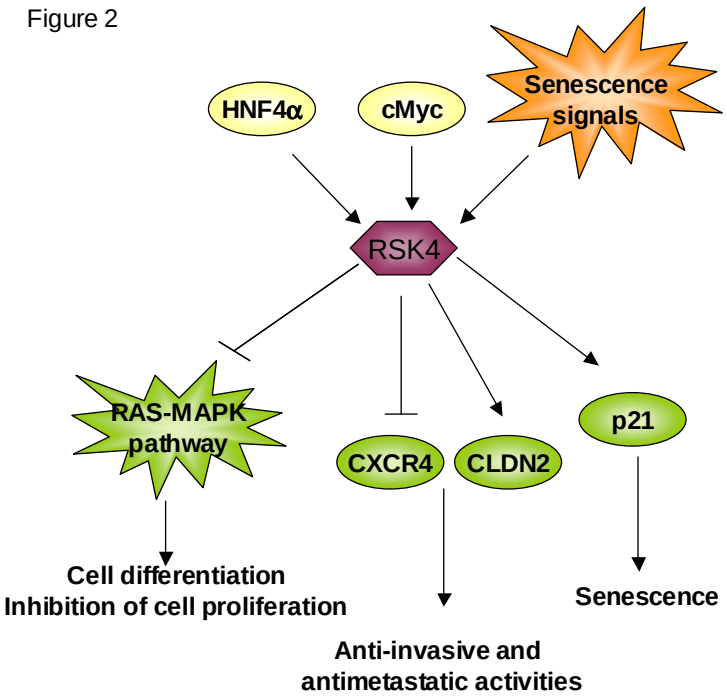


Figure 2



AGRAÏMENTS

Quan ja fa més de cinc anys, vaig aparèixer al laboratori per fer pràctiques no em podia imaginar que arribaria fins aquí. No és fàcil arrencar un projecte de cero en un laboratori que també està arrencant, però quan tens al voltant a la gent que jo he tingut, llavors tot sembla més fàcil. I ara, mirant en perspectiva, després de passar uns mesos durs amb el final de la tesi, m'adono de que aquí he sigut molt feliç.

Santiago, quiero agradacerte que me dieras la oportunidad de dedicarme a esto, porqué desde que tengo uso de la razón siempre he soñado con trabajar en un laboratorio de investigación. Gracias también por haber confiado en mi y por supuesto por haber dirigido este proyecto.

Gemma, a tu haig d'agrair-te tantes coses! En primer lloc gràcies per haver acceptat ser la meva codirectora, i sobretot gràcies pel teu optimisme, per aixecar-me sempre la moral en els moments durs i per ensenyar-me tant. La veritat és que no puc imaginar a ningú millor, segur que sense tu no hagués arribat fins aquí.

Rosa i Teresa! Moltes gràcies per ser com sou, simplement genials! Totes dues sou per mi un exemple a seguir. Gràcies pels riures, pels moments intentant solucionar el món, per la "molineta", per fer-me costat i per creure en mi. Meu aportat molta alegria i heu sigut una via d'escap quan m'agobiava. Sempre podia dir "me'n vaig a anatomia a veure a la Rosa i la Teresa" i sempre tornava a baix amb les piles carregades. Així que moltes gràcies per carregar-me les piles sempre que ho necessitat.

Javi! Tu has sido como un hermano mayor en el laboratorio, siempre te has preocupado de que todos estuvieramos bien, siempre promoviendo actividades colectivas... que ricos aquellos vermouts! Muchas gracias por todo, por sacar siempre tiempo para ayudarme a resolver tantas y tantas dudas... trabajar contigo es un placer.

MªAngeles y Ana, muchas gracias por los debates tan productivos (vale, no siempre científicos) que hemos mantenido en el despachito. Por haberme hecho reir, por haber ampliado mi vocabulario, (ea!; fisho) y por hacer que todo sea más ameno, sobretodo en esos días en los que todo sale al revés.

Laura, moltes gràcies per ser tant bona companya, pels teus ànims i per ajudar-me, especialment mentre estava en Amsterdam. Espero que arribis a disfrutar tant de la tesi com ho fet jo.

Cris, gràcies pels ànims, pels teus somriures, i per les bones estones fent unes cervessetes.

Núria, moltes gràcies per escoltar les meves queixes durant aquests anys però sobretot gràcies per ser com ets! Els dinars amb tu són terapèutics

Laura Fernández, o com a mi m'agrada més, K-rasito women, gràcies per la teva alegria, és contagiosa i em fa sentit molt bé.

Matilde, gracias por tus consejos, por tu amabilidad i por tu ayuda.

Berta, tu has estat amb mi gairabé des del principi i saps millor que ningú el que he he disfrutat i el que he patit fins arribar aqui. Hem sigut Zipi i Zape, sempre juntes... i la veritat és que ha sigut genial. Tinc tantes coses que agrair-te que ni tan sols trobo les paurles. Gràcies per les bosses i bosses de pipes que has compartit amb mi en el despatx, per preocupar-te dels meus experiments com si fossin teus, pels teus ànims, per ajudar-me sempre i per ser una gran amiga. No se que seria de mi si no t'hagués tingut com a companya. Eva, des del primer dia has sigut un referent per mi, per la teva forma de treballar i per la teva franquesa a l'hora de dir les coses. Gràcies per riure tant, per ser com ets i per possar una mica de seny quan les coses no anaven del tot bé. Eli, quan vas arribar vas aportar al laboratori el teu carisma, la teva alegria i... els entrepans! Si la teva mare sapigues que durant mesos també ens alimetava a la Berta i a mi! Mai havia vist uns entrepans tant bons! Res no és el mateix des de que no hi ets al laboratori, eres la nostre mama, junt amb l'Eva, sempre intentant que la Berta i jo mantinguéssim la calma. Us ho he dit a les tres mil vegades, sou el millor que he tret d'aquesta experiència, heu sigut les millors companyes (i amigues) del món. És increible trobar a algú en qui pots confiar la teva feia al cent per cent, amb qui pots treballar al màxim disfrutant al màxim, que sap exactament que fer per aixecar-te l'ànim. I jo n'he trobat a tres! Gràcies per les hores i hores de teràpia fent unes birres, gràcies pels moments inolvidables...el Fores, l'Estepi, Granada, Amsterdam, etc. Gràcies per les ficadures de pota, quantes ne'm fet? Millor ni en parlem!. Mai us podre agrair tot el heu fet per mi i tot el que heu aportat a la meva vida. Aquesta tesi també l'heu escrit vosaltres.

Aquesta feina, que és tant dura com gratificant, té el poder de ficar-se en el teu cap i moltes vegades arribes a casa tenint el cap encara en la feina,

pensant en com tirar el teu projecte endavant, esperant nerviós un resultat, pensant que fer l'endemà, i clar, la familia se'n resenteix.

Papas, muchas gracias por haberme escuchado, y sobretodo gracias por haber aguantado mi mal humor en los días duros, saber que contava con vuestro apoyo me ha hecho permanecer siempre firme para continuar hacia adelante. Tete, muchas gracias por estar siempre que te necesito, se que estás orgulloso de tu hermana pequeña, pero que sepas que yo también estoy muy orgulla de ti! Toni, muchas gracias por tu comprensión durante todo este tiempo y por animarme a luchar por lo que gusta. Sois mi familia y se que estais orgullosos de mi, pero sin vuestro apoyo y vuestra ayuda no lo habría conseguido.

Hi ha molta més gent a la que agrair, la Monica Higuera, l'Eva Naches, la Teresa Osteso, el Borja, i segur que se'm obliden més, a tots mil gràcies.

Mil gràcies també a les meves amigues de sempre, perqué per molt dura que fos una setmana, per molts experiments que no sortíssin bé, cada divendres estàveu al meu costat per intentar canviar al món i per riure de totes les nostres desgràcies.

"Si viviera dos o tres más vidas,
haría lo mismo una y mil veces,
que con creces me dieron de más,
mucho más de lo que uno merece."
E. Bunbury