



CIBBIM-Nanomedicina
Institut de Recerca Vall d'Hebron
Hospital de la Vall d'Hebron



Unitat de Biofísica-CEB
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Universitat Autònoma de Barcelona

TESI DOCTORAL UAB/ MARÇ 2011
DEPARTAMENT DE GENÈTICA

**CICLINA E2, NOVA DIANA DEL CHECKPOINT DE FASE S.
PAPER EN LA MODULACIÓ DE LA RESPOSTA A INHIBIDORS
DE LA TOPOISOMERASA I**

ÀNGEL GUERRA MORENO

Directors: Dr. Simo Schwartz Jr/ Dr. David G. Quintana



CIBBIM-Nanomedicina
Institut de Recerca Vall d'Hebron
Hospital de la Vall d'Hebron



Unitat de Biofísica-CEB
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Universitat Autònoma de Barcelona

**CICLINA E2, NOVA DIANA DEL CHECKPOINT DE FASE S. PAPER
EN LA MODULACIÓ DE LA RESPOSTA A INHIBIDORS DE LA
TOPOISOMERASA I**

Memòria presentada per optar al grau de Doctor en Genètica per la Universitat Autònoma
de Barcelona
Març 2011

Dr. Simo Schwartz Jr
Director de la Tesi Doctoral

Dr. David G. Quintana
Director de la Tesi Doctoral

Dr. Oriol Cabré
Tutor de la Tesi Doctoral

Àngel Guerra Moreno
Doctorant

A mis abus, mi mama
y mi niña.

Índex

INTRODUCCIÓ	1
1. CICLE CEL·LULAR I CÀNCER.....	3
2. CICLE CEL·LULAR EUCARIOTA.....	3
2.1 Fases del cicle cel·lular.....	4
2.2 Control del cicle cel·lular.....	6
2.2.1 Complex ciclina-CDK.....	6
2.2.1.1 Activació del complex ciclina-CDK.....	8
2.2.1.2 Inhibició del complex ciclina-CDK.....	8
2.2.1.3 Inhibidors de les CDK (CKI).....	9
2.2.2 Ubiquitina lligases.....	10
2.3 Ciclines E.....	11
2.3.1 Funcions de les ciclines E.....	12
2.3.1.1 Transició G1/S.....	13
2.3.1.2 Iniciació de la replicació.....	13
2.3.1.3 Altre funcions de les ciclines E.....	14
2.3.2 Ciclines E i càncer.....	15
2.3.2.1 Ciclines E i resposta a quimioteràpics.....	16
3. MECANISMES DE VIGILÀNCIA CEL·LULAR.....	17
3.1 <i>Checkpoint</i> de fase S.....	18
3.2 Resposta del <i>checkpoint</i> de fase S.....	20
3.2.1 Protecció de la replicació.....	20
2.3.1.1 Estabilització de les forquilles de replicació.....	21
2.3.1.2 Inactivació dels orígens de replicació tardans.....	22
2.3.1.3 Remodelació de la cromatina.....	22
2.3.2 Canvis en el patró d'expressió gènica.....	23
2.3.3 Bloqueig del cicle cel·lular.....	24
2.3.4 Recuperació del <i>checkpoint</i> de fase S.....	24
2.3.5 Apoptosi.....	25
3.3 <i>Checkpoint</i> de fase S en humans.....	25
3.3.1 Activació dels <i>checkpoint</i> de fase S.....	26
3.3.1.1 Senyals d'activació.....	26
3.3.1.2 Complexos sensors.....	27
3.3.1.2.1 Complex 9-1-1/complex RAD17.....	27
3.3.1.2.2 Complex MNR.....	28
3.3.1.3 Transductors centrals.....	28

3.3.1.3.1 ATR.....	28
3.3.1.3.2 ATM.....	29
3.3.1.4 Adaptadors.....	29
3.3.1.4.1 CLSPN.....	30
3.3.1.4.2 BRCA1.....	30
3.3.1.5 Quinases efectores.....	30
3.3.1.5.1 CHK1.....	32
3.3.1.5.2 CHK2.....	32
3.4 <i>Checkpoint</i> de fase S en <i>S. cerevisiae</i>	32
3.5 Mecanisme de vigilància de la fase S en càncer.....	34
4. INHIBIDORS DE LA TOPOISOMERASA I.....	35
MOTIU DE LA TESI	39
OBJECTIUS	43
MATERIALS I MÈTODES	47
1. TÈCNIQUES EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49
1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49
1.2 Medis de cultiu.....	50
1.3 Soques.....	51
1.4 Obtenció de soques.....	51
1.4.1 Obtenció de soques per deleció.....	51
1.4.2 Obtenció de soques que expressen una proteïna etiquetada.....	53
1.5 Transformació de soques de llevat.....	54
1.6 Comprovació de les soques.....	55
1.6.1 Comprovació de la soca <i>mec1Δ</i>	55
1.6.2 Prova funcional de la soca <i>mec1Δ</i>	57
1.6.3 Comprovació de les soques <i>SMC2-3HA</i> per WB.....	57
1.7 Índex de gemmació.....	57
1.8 Sincronització de cultius en fase G1.....	58
1.9 Activació dels <i>checkpoint</i> de fase S en <i>S. cerevisiae</i>	58
1.10 Citometria de flux activada per fluorescència.....	59
1.11 Extracció de proteïnes.....	60
1.12 Quantificació de la concentració de proteïnes per 2D-DIGE.....	62
1.13 Immunoprecipitació.....	62
1.14 Western blot.....	63
1.15 Anàlisi 2D-DIGE.....	64
1.15.1 Disseny experimental.....	65

1.15.2	Neteja de les mostres.....	66
1.15.3	Marcatge de les mostres.....	66
1.15.4	Electroforesi primera dimensió.....	66
1.15.5	Electroforesi segona dimensió.....	68
1.15.6	Adquisició i anàlisi d'imatges.....	68
1.16	Identificació de proteïnes per espectroscopia de masses.....	69
2.	TÈCNiques EN LÍNIes HUMANES.....	70
2.1	Cultius de línies humanes cel·lulars humanes.....	70
2.2	Extracció de RNA en cèl·lules HeLa amb TRIzol.....	70
2.3	Microxips.....	71
2.3.1	Microelectroforesi en BioAnalyzer 2100.....	71
2.3.2	Retrotranscripció de RNA a cDNA.....	72
2.3.3	Marcatge de les sondes.....	73
2.3.4	Fragmentació de les sondes.....	74
2.3.5	Hibridació dels microxips.....	75
2.3.6	Rentats i tinció de les sondes.....	75
2.3.7	Detecció de la fluorescència dels microxips.....	76
2.3.8	Anàlisi.....	76
2.4	Retrotranscripció del RNA per PCR a temps real.....	77
2.5	PCR a temps real.....	78
2.6	Clonació del cDNA de la ciclina E2 en pLENTI4/V5-DEST.....	80
2.6.1	Comprovació dels clons recombinants.....	83
2.7	Tractaments per avaluar l'activitat de l'expressió gènica induïda pel <i>checkpoint</i>	83
2.7.1	Sincronització cel·lular en la transició G1/S.....	84
2.7.2	Alliberament dels cultius sincrònics.....	85
2.8	Citometria de flux activada per fluorescència.....	85
2.9	Obtenció de clons estables d'expressió constitutiva per la ciclina E2 en HeLa.....	86
2.9.1	Producció de lentivirus.....	86
2.9.2	Transducció de les cèl·lules HeLa i selecció dels clons positius.....	87
2.10	Assaig de viabilitat cel·lular.....	88
2.11	Extracció de proteïnes en cèl·lules de mamífer.....	89
2.12	Quantificació de la concentració de proteïna.....	89
2.13	Western blot.....	90
3.	TÈCNiques GENERALS.....	90

3.1 Preparació d' <i>E. coli</i> quimiocompetents.....	90
3.2 Transformació química d' <i>E. coli</i>	91
3.3 Extracció del DNA plasmídic amb STET.....	91
3.4 Electroforesi d'àcids nuclèics.....	92
RESULTATS	95
1. IDENTIFICACIÓ DE DIANES DEL CHECKPOINT DE FASE S MITJANÇANT	
APROXIMACIÓ PROTEÒMICA: TÈCNICA 2D-DIGE	97
1.1 Construcció i comprovació de la soca defectiva del <i>checkpoint</i> per	
deleció del transductor <i>MEC1</i>	99
1.2 Obtenció de les mostres per l'anàlisi proteòmic.....	101
1.2.1 Sincronització cel·lular dels cultius <i>MEC1+</i> i <i>mec1Δ</i>	101
1.2.2 Alliberament dels cultius sincrònics en condicions d'estrès	
replicatiu.....	103
1.3 Anàlisi 2D-DIGE.....	105
1.4 Identificació de les proteïnes per espectroscopia de masses.....	108
1.5 Estudi dels candidats d'interès.....	111
1.5.1 Smc2p.....	111
1.5.1.1 Obtenció de les soques Smc2-3HA.....	112
1.5.1.2 Comprovació de Smc2p com a diana del <i>checkpoint</i>	114
1.5.2 Scp160p.....	117
1.5.2.1 Comprovació de Scp160p com a diana del <i>checkpoint</i>	118
2. IDENTIFICACIÓ DE DIANES DEL CHECKPOINT DE FASE S MITJANÇANT	
BIOLOGIA MOLECULAR: MICROXIPS D'EXPRESSIÓ	123
2.1 Tractament dels cultius de cèl·lules HeLa.....	125
2.2 Extracció i anàlisi de RNA.....	126
2.3 Microxips d'expressió.....	126
2.4 Validació dels resultats mitjançant PCR a temps real.....	141
2.5 Estudi de la ciclina E2 com a diana del <i>checkpoint</i> de fase S.....	143
2.5.1 Avaluació dels nivells de ciclina E2 en un cicle cel·lular no pertorbat....	146
2.5.2 Avaluació dels nivells de ciclina E2 en una fase S pertorbada.....	149
2.5.3 Nivells de ciclina E2 en condicions d'estrès replicatiu i	
<i>checkpoint</i> inhibít.....	151
2.5.4 Confirmació de ciclina E2 com a diana del <i>checkpoint</i> en HEK293T.....	153
2.5.5 Mecanisme d'acumulació de la ciclina E2 induït pel <i>checkpoint</i>	156
2.5.6 Efecte de l'acumulació de la ciclina E2.....	160

3. PAPER DE LA CICLINA E2 EN LA RESPOSTA A LA CAMPTOTECINA	
<i>in vitro</i>	165
3.1 Clonatge de <i>CCNE2</i> en el vector d'expressió pLENTI4/V5-DEST.....	168
3.2 Obtenció de cèl·lules HeLa que sobreexpressen de forma estable	
la ciclina E2.....	169
3.2.1 Producció dels lentivirus.....	169
3.2.2 Transducció de les cèl·lules HeLa i selecció dels clons positius.....	169
3.2.3 Comprovació dels clons transduïts amb pLENTI4- <i>CCNE2</i>	169
3.3 Assaig de viabilitat cel·lular.....	170
DISCUSIÓ	173
1. Identificació de noves dianes del <i>checkpoint</i> de fase S a través de	
2D-DIGE en <i>S. cerevisiae</i>	175
1.1 Smc2p.....	177
1.2 Scp160p.....	179
2. Identificació de noves dianes del <i>checkpoint</i> de fase S a través de microxips	
d'expressió en cèl·lules humanes.....	180
2.1 El mecanisme de manteniment de la integritat genòmica estabilitza la	
ciclina E2 en resposta a estrès replicatiu.....	182
2.2 L'estabilització de la síntesi de la ciclina E2 requereix síntesi <i>de novo</i>	
però no és suficient.....	184
2.3 Paper de la ciclina E2 en la resposta a estrès replicatiu.....	186
2.4 Model proposat de la regulació de la ciclina E2 a través de l'activació	
del <i>checkpoint</i>	187
3. Ciclina E2 en la resposta a camptotecina.....	187
CONCLUSIONS	191
BIBLIOGRAFIA	197
ABREVIATURES	223

Introducció

“Basta mirar alguna cosa amb atenció per a què es torni interessant”

Eugeni d'Ors (Escriptor)

1. Cicle cel·lular i càncer

En les últimes dues dècades s'han observat un gran número de mutacions en gens que codifiquen per proteïnes implicades en el cicle cel·lular en tumors primaris i línies tumorals. El conjunt dels resultats mostren que aquestes mutacions són les més comunes en cèl·lules transformades i estan presents en el 100% dels tumors (Clurman and Roberts, 1995).

La relació entre cicle cel·lular i càncer és obvia, la maquinària del cicle cel·lular controla de forma ordena la proliferació cel·lular, mentre que el càncer es caracteritza per ser una malaltia amb una proliferació cel·lular excessiva i descontrolada. Aquesta pèrdua del control ve donada per diferents mecanismes: independència de les senyals mitòtiques per progressar al llarg del cicle, reducció del requeriment nutricional, baixada de l'adherència cel·lular al teixit o acceleració del cicle cel·lular. La proliferació anòmala pot ser explicada per mutacions que produeixen la pèrdua o guany de funció de proteïnes de la maquinària del cicle cel·lular. Les mutacions que impliquen guany de funció es produeixen en proteïnes implicades en rutes de senyalització que promouen la proliferació. Aquestes seqüències són conegudes com protooncogens. L'efecte d'aquestes mutacions és l'activació de les vies de forma constitutiva, induint a què la cèl·lula perdi la regulació per part dels sistemes de control del cicle. Un cop mutades aquestes proteïnes són conegudes com oncogens.

Les mutacions per pèrdua de funció es produeixen en proteïnes que regulen negativament la progressió del cicle cel·lular i estan implicades en rutes metabòliques del control del mateix. Aquestes mutacions es produeixen en els gens supressors de tumors.

2. Cicle cel·lular eucariota

El cicle cel·lular és un conjunt de processos seqüencials que condueixen al creixement cel·lular, la replicació del genoma i la divisió en dues cèl·lules filles, iguals entre si i amb la cèl·lula mare. És crucial en el desenvolupament i creixement dels organismes pluricel·lulars, així com en els processos de renovació i reparació tissular dels òrgans.

El cicle està altament regulat, així per a què les cèl·lules progressin d'una fase a la següent han d'haver completat la fase prèvia amb èxit.

2.1 Fases del cicle cel·lular

El cicle cel·lular eucariota està format per quatre fases (figura 1):

- **Fase G₁** (Interval 1): També coneguda com interfase. És la primera fase del cicle i transcorre entre la formació de les cèl·lules filles i l'inici de la replicació del DNA. Es caracteritza per un creixement cel·lular produït per la síntesi de RNA i proteïnes i per la proliferació dels orgànuls citoplasmàtics.
- **Fase S** (Síntesi): és la fase on es replica el DNA. És una de les fases més crítiques del cicle donat que la informació genètica s'ha de mantenir amb la màxima fidelitat. Cada cromosoma es replica donant lloc a dos cromàtides germanes idèntiques unides pel centròmer.
- **Fase G₂** (Interval 2): en aquest període les cèl·lules es preparen per dividir-se, en conseqüència es torna a produir una gran activitat de síntesi proteica per poder entrar, progressar i sortir de la mitosi. Durant G₂ es verifica la correcta replicació del genoma i es reparen els errors.
- **Fase M** (Mitosi): es produeix la condensació dels cromosomes i la seva segregació de manera equitativa, així com el procés de citocinesi a partir del qual la cèl·lula progenitora divideix el seu citoplasma. Ambdós processos tenen com a resultat la formació de dos cèl·lules filles iguals entre si.

La fase M consta de les següents etapes:

- **Profase:** S'inicia amb el desacoblament de l'embolcall nuclear. La cromatina replicada es condensa gràcies als complexos condensina generant els cromosomes. Els microtúbuls del citoesquelet cel·lular es polimeritzen i comencen a formar el fus mitòtic.
- **Prometafase:** Complexos proteics s'uneixen als centròmers formant els cinetocors, a partir dels quals els cromosomes interaccionen amb els microtúbuls del fus.
- **Metafase:** Els microtúbuls del fus exerceixen tensió sobre els cromosomes que es disposen alineats en el plànol equatorial de la cèl·lula. Els microtúbuls es troben ancorats als pols cel·lulars mitjançant els centrosomes.

- Anafase: Els cinetocors es separen i en conseqüència, cada cromàtide germana es segregada a un pol cel·lular per la tensió exercida pels centrosomes.
 - Telofase: Les cromàtides germanes arriben als pols cel·lulars i es comencen a descondensar. Es reacobra l'embolcall nuclear i el fus mitòtic es despolimeritza.
 - Citocinesi: Es dona el repartiment del citoplasma entre les cèl·lules filles. En cèl·lules animals es produeix per estrangulació de la membrana cel·lular per l'anell contràctil format per filaments d'actina. Com a resultat d'aquest procés es formen les cèl·lules filles.
- **Fase G0:** és el període en què les cèl·lules estan en estat quiescent, és a dir, que es troben en estat de repòs del cicle cel·lular, tot i que continuen mantenint les seves funcions bàsiques. Les cèl·lules poden entrar en G0 per diferents motius: falta de factors de creixement, per diferenciació (es donen en organismes pluricel·lulars quan les cèl·lules s'especialitzen en funcions determinades) o per inducció a partir del *checkpoint* de fase G1, on s'engloba la senescència replicativa. Durant aquest període es desmantella la maquinària del cicle cel·lular, i les ciclines i CDK són degradades. No obstant això, l'estat quiescent és reversible, les cèl·lules poden ser estimulades per entrar novament en cicle entrant en fase G1.

Les fase S i M són les més controlades del cicle cel·lular, ja que són clau per mantenir l'estabilitat genòmica i evitar el desenvolupament de processos tumorals en organismes pluricel·lulars (Alberts et al., 2002).

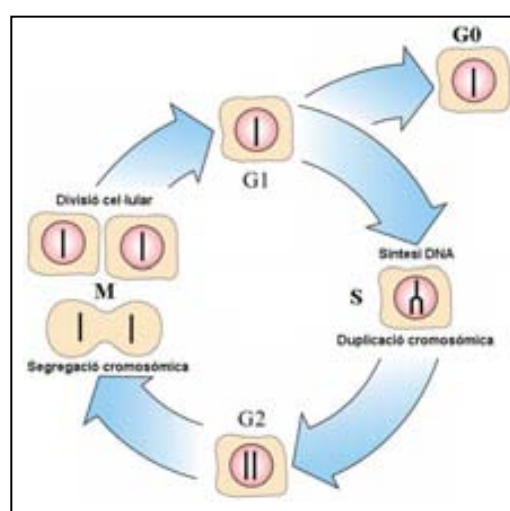


Figura 1. Cicle cel·lular eucariota. Figura adaptada de la web www.nobelprize.org.

2.2 Control del cicle cel·lular

El cicle cel·lular està regulat per diferents complexos, els més destacats són i) ciclines-CDK (*Cyclin-dependent Kinase*), encarregats de conduir a les cèl·lules de forma ordenada a través de les diferents fases, ii) els complexos ubiquitina lligases i iii) els mecanismes de control o *checkpoints*.

2.2.1 Complex ciclina-CDK

Els complexos ciclina-CDK regulen la progressió al llarg del cicle cel·lular. Per dur a terme la seva funció les dues subunitats han d'interaccionar (Solomon et al., 1990).

Les ciclines van ser descobertes originàriament per Tim Hunt com proteïnes que presentaven oscil·lacions en els seus nivells d'expressió al llarg del cicle cel·lular (Evans et al., 1983). Actualment es defineixen com a membres d'una superfamília amb similituds estructurals que uneixen i activen les subunitats catalítiques de la família CDK a través del domini caixa ciclina, per tant formen la subunitat reguladora del complex (Jeffrey et al., 1995; Malumbres and Barbacid, 2005; Nugent et al., 1991).

Cada fase del cicle es caracteritza per l'expressió de diferents tipus de ciclina, permetent així la regulació diferencial de les CDK. Cada ciclina es pot unir a una o dues subunitats catalítiques regulant l'activitat quinasa i conferint diferents especificitats.

Existeixen diferents tipus de ciclines que regulen funcions tant diverses com el control del cicle cel·lular, la transcripció, la diferenciació i l'*splicing* alternatiu (Chen et al., 2006; Murray and Marks, 2001).

Les ciclines de cicle cel·lular s'agrupen en quatre grups: ciclines de fase G1 (ciclines D), de fase S (ciclines E i A) i ciclines mitòtiques (ciclines A i B).

Les funcions de les ciclines van lligades a les oscil·lacions dels seus nivells al llarg del cicle cel·lular que venen reflectides pels nivells dels seus mRNA, així com de la seva destrucció guiada pels complexos ubiquitina lligases (Morgan, 1995) (figura 2).

Actualment es pensa que l'especificitat de substrat dels complexos ciclina-CDK ve donada bàsicament pel moment d'expressió de cada ciclina i la seva localització, determinant l'activació espai-temporal de cada complex [revisat en (Murray, 2004)].

Les CDK són les subunitats catalítiques del complex; presenten activitat Ser/Thr quinases i són capaces d'unir-se i ser activades per les ciclines.

Les CDK formen una família extensa, es poden trobar els seus membres al llarg de tota l'escala filogenètica, des dels llevats fins mamífers superiors, presentant una gran homologia. Així en *S. pombe* i *S. cerevisiae* només es troba una subunitat cdk (Cdc2p i Cdc28p respectivament) que s'unirà a les diferents ciclins (Nurse and Thuriaux, 1980), en eucariotes superiors les funcions de les CDK de cicle cel·lular es troben repartides i especialitzades en diferents membres de la família.

Les CDK es sintetitzen en un estat basal d'inactivitat i no s'activen fins que s'uneixen a la seva ciclina corresponent pel motiu PSTAIRE que és altament conservat entre els membres de la família (Jeffrey et al., 1995). En forma monomèrica les CDK presenten un domini anomenat *T-loop* que bloqueja el centre actiu (domini quinasa) mantenint-les inactives (De Bondt et al., 1993).

Una altra característica de les CDK és que presenten temps de vida mitja elevat, mentre que les ciclins presenten una vida mitja molt més curta. Les CDK, igual que les ciclins, es poden classificar segons la fase del cicle en que actuen, d'aquesta manera tenim les quinases de fase G1, CDK4 i 6 (uneixen a les ciclins de la família D); de fase S, CDK2 (que s'acomplexen amb les ciclins E i A) i de mitosi, CDK1 (s'uneix tant amb les ciclins A com a les B) (figura 2).

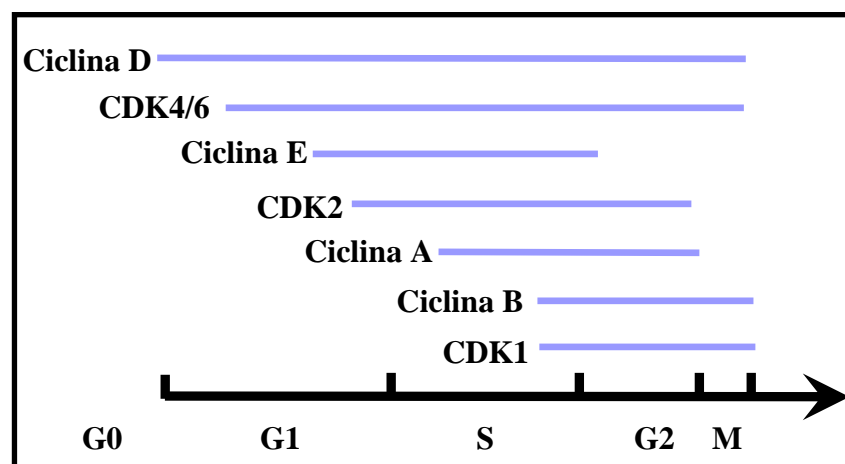


Figura 2. Patró d'expressió de les ciclins i activitats CDK al llarg del cicle cel·lular. CDK2 pot ser activada per ciclina E i A, mentre que CDK1 per ciclina A i B. Figura modificada de (Obaya and Sedivy, 2002).

2.2.1.1 Activació del complex ciclina-CDK

Tant les ciclines com les CDK estan subjectes a modificacions post-traduccionals per fosforilacions que permeten l'activació i la modulació del complex (Morgan, 1995, 1997).

El primer esdeveniment necessari per l'activació del complex és l'ensamblatge entre una CDK i la seva ciclina respectiva (Kato et al., 1994; Matsuoka et al., 1994; Solomon et al., 1990). Aquesta unió es produeix entre la caixa ciclina de les ciclines i el motiu PSTAIRE de les CDK, provocant un canvi conformacional de la subunitat catalítica de forma que el *T-loop* deixa lliure el domini quinasa i passa a interaccionar amb la ciclina (De Bondt et al., 1993).

L'ensamblatge del complex condueix a una activació parcial de la subunitat catalítica.

L'activació completa es produeix per la fosforilació d'un residu treonina crític del domini *T-loop* de totes les subunitats catalítiques que el presenten; per exemple en CDK1 és la Thr161 i en CDK2 la Thr160 (Gu et al., 1992; Kaldis, 1999). Aquest residu és modificat per un complex quinasa anomenat CAK (*CDK-Activating Kinase*) (Kaldis, 1999) que, alhora, és format per una subunitat Cdk, CDK7, i la ciclina H (Fisher and Morgan, 1994). Aquest complex quinasa es present al llarg de tot el cicle cel·lular.

La fosforilació en aquest residu treonina augmenta l'activitat del complex ciclina-CDK i, a més, incrementa l'estabilització del mateix (Chen et al., 2003).

2.2.1.2 Inhibició del complex ciclina-CDK

Un cop les ciclines han completat la seva funció són degradades per a què les cèl·lules puguin continuar progressant al llarg del cicle. Principalment es degraden per dues vies:

1. Desfosforilació del residu treonina activador regulat pel complex CAK. Aquesta acció la catalitza la fosfatasa KAP (*Kinase-Associated Phosphatase*) (Hannon et al., 1994). Aquesta fosfatasa interacciona amb les CDK1 i 2. La desfosforilació d'aquests residus provoca la separació de les dues subunitats afavorint la degradació de la ciclina (Poon and Hunter, 1995) (Veure la figura 3).

2. Fosforilació dels residus Thr14 i Tyr15 a la regió N-terminal de les CDK, concretament a la regió d'ancoratge de l'ATP utilitzat pel domini quinasa. Aquesta regió canvia la seva conformació impossibilitant la interacció amb l'ATP (Morgan, 1995, 1997). Aquestes fosforilacions inhibidores requereixen la unió prèvia de la subunitat ciclina. Fins l'actualitat no es coneix amb seguretat quines són les quinases responsables. Les candidates proposades són les quinases WEE1 i MYT1 (*membrane associated tyrosine/threonine 1*) per

la fosforilació d'aquests residus en CDK1 i CDK2 (McGowan and Russell, 1993; Mueller et al., 1995; Parker and Piwnica-Worms, 1992) (figura 3).

La desfosforilació activadora dels residus Thr14 i Tyr15 es controlada pels membres de la família de fosfatases CDC25 (Nilsson and Hoffmann, 2000) (figura 3). Aquestes fosfatases juguen un paper important en l'aturada del cicle cel·lular generat per l'activació dels mecanismes *checkpoint* en resposta a dany en el DNA, com s'explica més endavant.

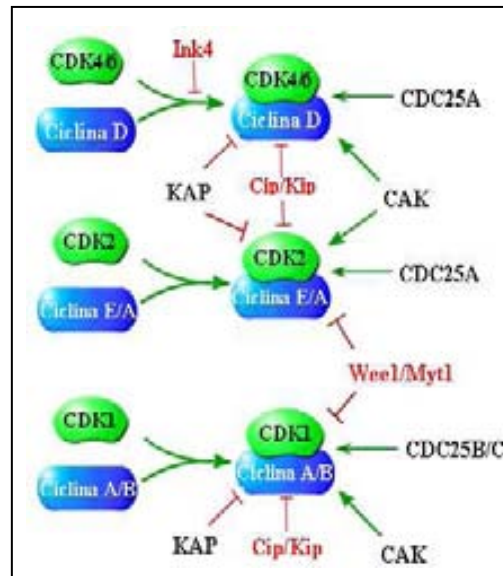


Figura 3. Mostra els diferents complexos ciclina-CDK que condueixen la progressió al llarg del cicle cel·lular i els diferents elements que els regulen. Figura modificada de (Obaya and Sedivy, 2002).

2.2.1.3 Inhibidors de les CDK (CKI)

Un altre mecanisme de regulació dels complexos ciclina-CDK és la interacció amb pèptids inhibidors de les CDK (Sherr and Roberts, 1999).

S'han descrit dues famílies de proteïnes inhibidores segons la seva evolució, estructura i especificitat envers les CDK: la INK4 (*inhibitor CDK4*) i la Cip/Kip (figura 3).

La família INK4 consta de quatre membres: p16^{INK4a} (Serrano et al., 1993), p15^{INK4b} (Hannon and Beach, 1994), p18^{INK4c} (Guan et al., 1994) i p19^{INK4d} (Chan et al., 1995), tots ells s'uneixen a les quinases CDK4 i CDK6, interferint en l'associació amb les ciclins de la família D (Parry et al., 1995).

L'acció dels membres d'aquesta família sobre les seves dianes provoca una aturada en G1, ja que evita que les proteïnes de la família retinoblastoma siguin fosforilades i, en

conseqüència, els factors de transcripció E2F romanen segrestats, inhibint així la transcripció de les proteïnes necessàries per superar la transició G1/S i la progressió per la fase S.

Els membres de la família Cip/Kip presenten un ampli espectre d'acció, afectant els complexos de ciclina D, E, A i B amb les seves respectives CDK. Es caracteritzen perquè poden unir-se tant a les ciclines com a les subunitats catalítiques per inhibir el complex (Chen et al., 1995). Provocant un canvi conformacional en el domini actiu de les CDK, evitant així que interaccionin amb les seves dianes.

Aquesta família es formada per p21^{Cip1/Waf1/Sdi1} (Xiong et al., 1993), p27^{Kip1} (Polyak et al., 1994) i p57^{Kip2} (Lee et al., 1995).

2.2.2 Ubiquitina lligases

Els complexos ubiquitina ligasa formen el sistema més important per la degradació de components del cicle cel·lular, esdeveniment imprescindible per la progressió al llarg del cicle. Hi han dos complexos estructuralment similars que duen a terme aquesta funció, són els complexos E3 ubiquitina ligasa.

- Complex Skp-Cullin-F-Box (SCF).
- *Anaphase-Promoting Complex* (APC).

Els complexos E3, són els encarregats de reconèixer proteïnes específiques, treballen conjuntament amb l'enzim E1 que activa el grup ubiquitina i el transfereix a l'enzim E2, aquest finalment transferirà el grup a la proteïna diana. Les proteïnes ubiquitinades són reconegudes i degradades pel proteasoma.

El complex SCF exerceix la seva funció des del final de la fase G1 i al llarg de tota la fase S, inactivant-se al principi de la fase G2.

El seu nucli es format per les proteïnes Skp1 (*S-phase kinase-associated protein 1*), Cdc34 (*cell division cycle 34 homolog*) i Cul1 (*Cullin 1*) (Lisztwan et al., 1998; Lyapina et al., 1998) (figura 4A). L'especificitat en el reconeixement de les dianes del complex ve donada per l'existència d'un gran nombre de factors que s'activen i interaccionen amb el complex en moments concrets del cicle, aquests factors formen una família proteica caracteritzada per la presència de dominis caixa-F (Skowyra et al., 1997). Aquest domini és crucial en la interacció amb el nucli de SCF a través de SKP1 (Schulman et al., 2000). Fins a dia d'avui

s'han descrit més de 70 proteïnes d'aquesta família, on destaquen membres com SKP2, CDC4 o β -TrCP.

Algunes de les proteïnes degradades per SCF són les ciclins D i p21^{Cip1/Waf1} mitjançant el factor SKP2 (Yu et al., 1998b) i ciclina E i c-Myc mitjançant CDC4 (Koepp et al., 2001; Yada et al., 2004).

El complex APC esdevé totalment actiu a la metafase, regulant així la transició i progressió per la fase M (Page and Hieter, 1999; Peters, 1998). Està constituït per un nucli de 11 subunitats que van d'APC1 fins APC11 (Yu et al., 1998a) (figura 4B). La seva especificitat envers les seves dianes ve donada pels factors CDC20 (*cell division cycle 20 homolog*) i CDH1 que es caracteritzen per la presència de dominis WD-40 (Page and Hieter, 1999; Peters, 1998). En aquest cas els dominis WD40 serveixen per reconèixer les caixes de destrucció de les proteïnes diana (Kraft et al., 2005).

APC regula la ubiquitinació de diferents proteïnes al llarg de la fase M, com per exemple marca per destrucció les ciclins A durant la prometafase (Geley et al., 2001) i de les ciclins B en la metafase, totes dues controlades pel factor CDC20, acció imprescindible per a què les cèl·lules puguin completar la fase M del cicle.

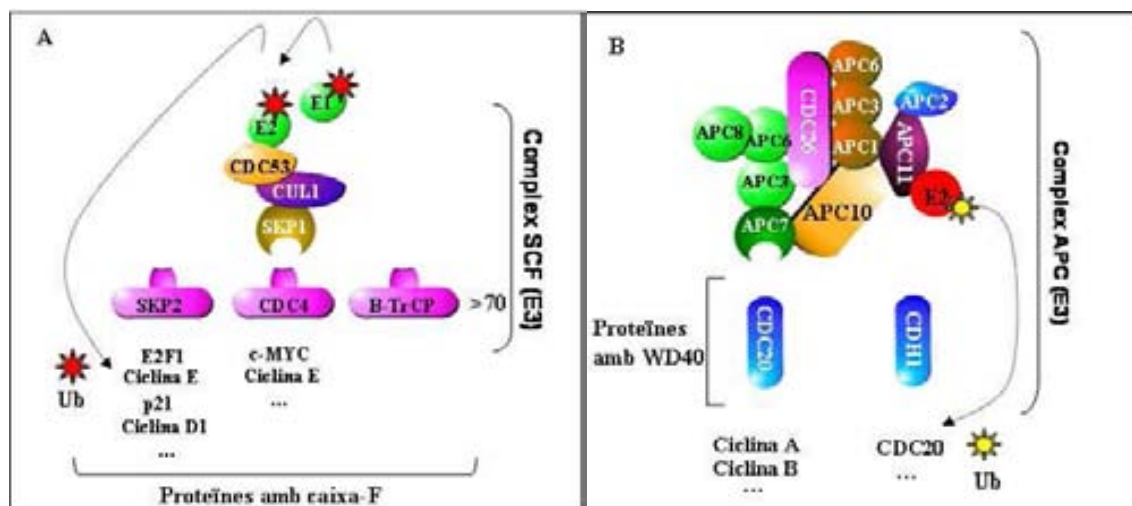


Figura 4. Estructura i funcionament dels complexos ubiquitina lligases E3 que controlen la progressió del cicle cel·lular. (A) Complex SCF, modificat de (Nakayama and Nakayama, 2005). (B) Complex APC modificat de (Castro et al., 2005).

2.3 Ciclines E

En eucariotes superiors, la família de les ciclins E és formada pel producte de dos gens independents que codifiquen dues proteïnes que comparteixen una homologia de 71% a nivell de seqüència. Són la ciclina E1 (Koff et al., 1991; Lew et al., 1991) i la ciclina la E2

(Gudas et al., 1999; Lauper et al., 1998). En canvi, l'ortòleg funcional de les ciclins E en llevat de gemmació és format per una única proteïna anomenada Clb6 (Schwob and Nasmyth, 1993).

S'ha demostrat que les dues ciclins E presenten nivells d'acumulació cíclics similars. Els nivells comencen a ser detectables cap el final de fase G1, presentant un pic en la transició G1/S. Un cop les cèl·lules entren en replicació els nivells de les proteïnes decauen fins desaparèixer quan la fase S és completada.

L'acumulació de les dues proteïnes es relaciona amb l'augment dels nivells dels seus RNA missatgers que són induïts pels factors de transcripció de la família E2F (*Elongation 2 factor*) (Lew et al., 1991; Zariwala et al., 1998) i per la regulació de la destrucció de les proteïnes mediada per la seva ubiquitinació (Clurman et al., 1996).

L'expressió de les ciclins E1 i E2 presenta un patró teixit dependent, de manera que l'expressió d'un dels membres normalment exclou l'expressió de l'altre. Tot i això hi han teixits on s'ha observat l'expressió de totes dues proteïnes (Zariwala et al., 1998).

La vida mitja de les ciclins E, com la de la major part de les ciclins de cicle cel·lular, és d'uns 30 minuts (Zariwala et al., 1998). La seva degradació es portada a terme per dues vies metabòliques diferents: quan la ciclina E no es troba unida a CDK2 és marcada per la degradació a través del complex E3-ubiquitin ligasa Cullin 3 (Singer et al., 1999), mentre que quan es troba unida a CDK2 és marcada pel complex SCF a través de la proteïna adaptadora CDC4 (Klotz et al., 2008; Koepp et al., 2001) i degradada pel 26 S proteasoma.

Les dues ciclins de la família E exerceixen la seva funció en el cicle cel·lular activant i regulant la quinasa CDK2 (Koff et al., 1991; Lauper et al., 1998). Aquests complexos són fosforilats i activats completament per la quinasa CAK en el residu Thr160 del *T-loop* de CDK2 (Desai et al., 1995; Gudas et al., 1999).

Els complexos ciclina E1-CDK2 i ciclina E2-CDK2 s'inactiven pels CKI de la família Cip/Kip, concretament per les proteïnes p27^{Kip1} i p21^{Cip1}. Aquests inhibidors aboleixen l'habilitat dels complexos quinasa de fosforilar les seves dianes ja que actuen com inhibidors competitius amb els substrats i prevenint la fosforilació activadora de CAK (Gudas et al., 1999; Lauper et al., 1998; Zariwala et al., 1998).

2.3.1 Funcions de les ciclins E

S'han associat diferents funcions als complexos ciclins E-CDK2. Les funcions més estudiades són el control de la transició G1/S i la iniciació de la replicació.

2.3.1.1 Transició G1/S

La progressió a través de la fase G1 és controlada pels complexos ciclina D-CDK4/6. Aquests complexos quinasa són els encarregats d'integrar les senyals mitòtiques extracel·lulars, així com el control del creixement i mida de la cèl·lula. Són els que regulen en quin moment la cèl·lula es troba preparada per entrar en el cicle cel·lular i dividir-se (Matsushime et al., 1994). Un cop assolit aquest moment, els complexos ciclina D-CDK4/6 fosforilen les proteïnes de la família del retinoblastoma (pRB, p130 i p107) (*pocket protein*) (Cobrinik, 2005). Aquestes proteïnes en estat desfosforilat s'uneixen i inactiven els factors de transcripció de la família E2F (Lam and La Thangue, 1994).

El procés de fosforilació de les *pocket proteins* s'inicia a la meitat de la fase G1, provocant que alguns dels membres de la família E2F es dissociïn de les proteïnes de la família del retinoblastoma. Els factors E2F alliberats indueixen els gens necessaris per progressar durant la transició G1/S i entrar en fase S. Uns dels gens induïts són els de les ciclines E (Geng et al., 1996).

Les ciclines E comencen a acumular-se i s'associen amb la subunitat quinasa CDK2, d'aquesta manera formen els complexos actius ciclina E1/E2-CDK2 que completen el procés de fosforilació de les *pocket proteins* actuant sobre residus addicionals de les pRB.

Un cop hiperfosforilades les *pocket proteins* es dissocien completament dels factors de transcripció E2F. Aquests, un cop lliures, completen la transcripció de gens necessaris per l'inici de la fase S i la seva progressió (figura 5).

Una vegada CDK2 és activa manté pRB hiperfosforilada, generant un procés de retroalimentació positiu, fent que la continuació del cicle cel·lular sigui independent de les senyals mitogèniques externes. Aquest punt del cicle cel·lular és conegut amb el nom de *START*, un cop la cèl·lula l'ha superat adquireix la capacitat irreversible de comprometre's a una divisió cel·lular [revisat en (Cross, 1995)]. Durant la resta del cicle, els complexos ciclina A-CDK2/CDK1 i ciclina B-CDK1 mantindran la fosforilació de les pRB.

2.3.1.2 Iniciació de la replicació

Una funció crítica dels complexos ciclina E-CDK2 és promoure la capacitat d'iniciar la replicació per començar la fase S, és a dir, que col·laboren en el reclutament regulat i progressiu de diversos complexos proteics en els orígens de replicació per poder iniciar la síntesi del DNA. Per fer-ho, el complex evita la degradació del factor CDC6 fosforilant-lo i així CDC6 recluta el complex de pre-replicació (pre-RC)

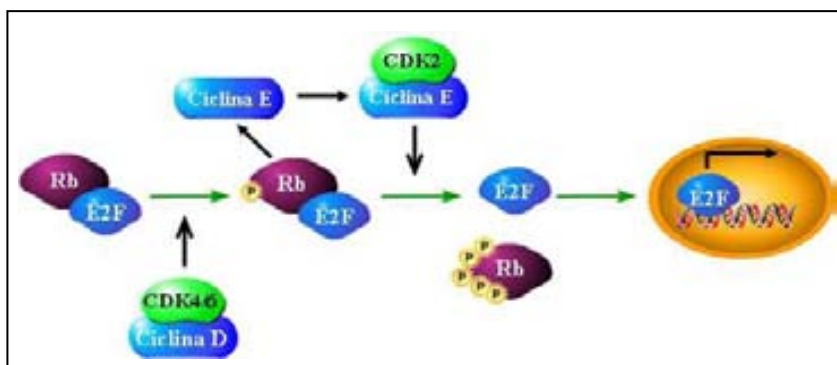


Figura 5. Paper dels complexos Ciclina D-CDK4/6 i Ciclina E1/E2-CDK2 regulant la transició G1/S a través del control de les proteïnes de la família de pRB (*pocket proteins*). Figura modificada de (Obaya and Sedivy, 2002).

als orígens de replicació de la cromatina (Mailand and Diffley, 2005; Petersen et al., 1999).

Interessantment, s'ha demostrat que la ciclina E promou la interacció del complex pre-RC de forma independent de CDK2, interaccionant amb els factors CDT1 i CDC6 en la cromatina i facilitant la unió del complex MCM (*Minichromosome maintenance complex*) que conforma la funció helicasa (Geng et al., 2003).

Una altra funció de les ciclines E al principi de fase S és el control de la duplicació dels centrosomes (Hinchcliffe et al., 1999). S'ha observat que el complex ciclina-CDK fosforila la fosfoproteïna nucleofosmina en el moment de la duplicació del centrosoma (Okuda et al., 2000) i també la quinasa MPS1 essencial pel procés, estabilitzant-la (Fisk and Winey, 2001).

La sobreexpressió de qualsevol de les ciclines E produeix una acceleració de l'entrada en fase S escurçant la fase G1. Paral·lelament també s'ha observat que alenteix la progressió a través de la fase S (Ohtsubo and Roberts, 1993; Resnitzky et al., 1994; Wimmel et al., 1994).

2.3.1.3 Altres funcions de les ciclines E

Per estudiar les funcions de les ciclines E i veure en quins processos es troben implicades, Geng i col·laboradors van generar ratolins deficientes per cada una de les ciclines E i també el doble *knock out* (KO) per les dues. Van observar que en contra del que es pensava, les ciclines E són dispensables pel desenvolupament embrionari en ratolins, mentre que en organismes com *Drosophila* i *C. elegans* són essencials (Fay and Han, 2000; Knoblich et al., 1994).

S'ha observat que el dèficit en les ciclines provoca problemes en els processos d'endoreplicació, és a dir, aquells processos on es replica el DNA nuclear, però no es produeix ni citocinesi. En ratolins doble KO el nombre de nuclis en les cèl·lules del trofoblast

(placenta) i en els megacariòcits (cèl·lules precursors de les plaquetes), dos tipus cel·lulars que generen processos endoreplicatius en mamífers, és significativament inferior que en els ratolins salvatges. Aquest fet concorda amb les observacions prèvies realitzades en els processos d'endoreplicació que es donen en les glàndules salivals de *Drosophila melanogaster* (Duronio and O'Farrell, 1995; Knoblich et al., 1994; Sauer et al., 1995), revelant que aquesta funció de les ciclins E és conservada al llarg de l'evolució.

S'ha postulat que les ciclins E en els processos endoreplicatius actuen afavorint l'ensamblatge el complex MCM, igual que en l'inici de la fase S, en els orígens de replicació (Su and O'Farrell, 1998).

Geng i col·laboradors també han associat el requeriment funcional de la ciclina E2 en el desenvolupament testicular i l'espermatogènesi, ja que els ratolins ciclina E2^{-/-} presenten un 50% d'esterilitat deguda a atròfia testicular.

2.3.2 Ciclines E i càncer

S'ha observat sobreexpressió dels membres de la família de les ciclins E en un elevat número de tumors primaris humans, destacant en càncer de mama amb un 30% dels casos (Payton et al., 2002), colon en un 53% (Dosaka-Akita et al., 2001), leucèmia mieloide aguda en 27% (Iida et al., 1997), leucèmia limfàtica crònica en 37% (Erlanson et al., 1998; Iida et al., 1997; Scuderi et al., 1996; Wolowiec et al., 1995), melanomes en un 36% (Bales et al., 1999), pulmó en 47% (Fukuse et al., 2000) i osteosarcomes en 47% (Molendini et al., 1998), entre d'altres.

La sobreexpressió de les ciclins de la família E s'ha relacionat amb diferents esdeveniments, com l'amplificació dels loci de les ciclins (Akama et al., 1995; Demetrick et al., 1995), la inhibició dels CKI, p27^{Kip1} i p21^{Cip1} per l'acció d'oncovirus (Quade et al., 1998; Weaver et al., 2000) o per mutacions del factor CDC4 implicat en la seva degradació (Moberg et al., 2001; Spruck et al., 2002). Aquesta desregulació s'ha proposat com un element causal en la tumorigènesi.

Ja a l'any 1999 Spruck i col·laboradors van demostrar que la sobreexpressió de la ciclina E1 provoca inestabilitat cromosòmica generant aneuploïdies i poliploïdies (Spruck et al., 1999). Aquest fet s'ha relacionat amb què les ciclins E controlen la duplicació dels centrosomes. Tumors on s'han detectat nivells elevats de la ciclina E que correlacionen amb alteracions en el número de centrosomes. Això ha fet hipotetitzar que la sobreexpressió de les ciclins E

generaria un número variable de centrosomes que alhora produirien fus mitòtics multipolars (Mussman et al., 2000; Pihan et al., 1998).

Tot i això, la implicació més acceptada de les ciclins E en el procés cancerós ve donada perquè la sobreexpressió de les ciclins E produeix la pèrdua del control de la fase G1, degut a que les proteïnes de la família del retinoblastoma es fosforilen abans de la transició G1/S. D'aquesta manera l'entrada de les cèl·lules en cicle cel·lular deixa de dependre de factors mitogènics, factors de creixement o sèrum en cèl·lules en cultiu, i de la mida de la cèl·lula (la mida cel·lular es troba reduïda). Això porta a un escurçament de la fase G1 (Ohtsubo and Roberts, 1993) i, per tant, a un augment de la taxa de proliferació cel·lular (Bedrosian et al., 2004).

La deleció de la ciclina E confereix resistència a les cèl·lules a ser transformades ja sigui per accions d'oncovirus, activació de c-Myc sol o amb KRAS, o per la introducció d'un dominant negatiu de p53, suggerint que la ciclina E pot ser un component clau en la senyalització tumoral (Geng et al., 2003).

2.3.2.1 Ciclines E i resposta a quimioteràpics

S'ha postulat que la disfunció de proteïnes implicades en la regulació del cicle cel·lular en tumors primaris humans pot afectar a la resposta cel·lular als quimioteràpics utilitzats en clínica (Smith and Seo, 2000; St Croix et al., 1996; Yang et al., 2000).

S'han publicat diferents treballs que intenten relacionar la sensibilitat a diferents agents quimioteràpics amb tumors que presenten sobreexpressió de ciclina E, existint certa controvèrsia ja que els resultats són contradictoris. Tots ells es centren en la ciclina E1, ja que va ser la primera en descobrir-se. El paper de la ciclina E2 en resposta a fàrmacs és encara una incògnita.

Es pensa que els quimioteràpics que actuen en fase S donaran una major resposta en tumors que sobreexpressin qualsevol de les ciclins E (Bedrosian et al., 2007), això es deu, com ja s'ha explicat, a que els alts nivells de ciclina provoquen un escurçament de la fase G1 i una major proporció de cèl·lules en fase S. En el mateix treball fet en tumors d'ovari, demostren com una elevada activitat quinasa del complex ciclina E1-CDK2 provoca un increment de la sensibilitat a les quimioteràpies basades en platí. La sobreexpressió de la ciclina ajuda a un augment de l'activitat del complex, tot i que, no sempre és possible la correlació.

No obstant, en fibroblasts murins que presenten alts nivells de ciclina E1 s'ha observat que confereixen resistència contra la doxorubicina, fàrmac inhibidor de la topoisomerasa II, tot i que, també genera espècies reactives d'oxigen, a través de les quals provoca l'acció citotòxica més important. La sobreexpressió de ciclina E1 promou alts nivells de la superòxid dismutasa, MgSOD, que elimina les espècies reactives d'oxigen produïdes per la doxorubicina augmentant, d'aquesta manera, la resistència contra el fàrmac (Sgambato et al., 2003).

Adicionalment s'ha comprovat que en càncer de mama la sobreexpressió de la ciclina E1 confereix a les cèl·lules tumorals resistència contra les teràpies basades en el bloqueig dels receptors d'estrògens. En aquests tipus de tumors s'ha observat que la proteasa elastasa fragmenta la ciclina E1 en diferents formes de baix pes molecular que són capaces d'activar la quinasa CDK2 (Porter et al., 2001).

Les teràpies antiestrògens provoquen un augment en els nivells dels CKI p21 i p27 a través dels quals indueixen un segrest del cicle cel·lular en la fase G1 (Dhillon and Mudryj, 2002). Quan es produeix la sobreexpressió de la ciclina E1 i es formen els fragments de baix pes molecular, els complexos ciclina E1 truncades-CDK2 no són inhibits per p21 i p27, generant la resistència i manteniment de la progressió (Akli et al., 2004).

3. Mecanismes de vigilància del cicle cel·lular

El cicle cel·lular es troba ordenat en processos moleculars seqüencials que depenen els uns dels altres, és a dir, que la iniciació dels esdeveniments tardans depèn del correcte compliment dels esdeveniments més primerencs. El correcte desenvolupament d'aquests processos seqüencials al llarg del cicle cel·lular es troba altament regulat pels mecanismes coneguts com a mecanismes de vigilància o *checkpoints* (Hartwell and Weinert, 1989).

Els *checkpoints* asseguren la correcta progressió de les cèl·lules al llarg de les diferents fases del cicle amb l'objectiu de mantenir la viabilitat cel·lular i la integritat genòmica (Hartwell and Weinert, 1989). Quan detecten errors d'algun tipus s'activen, generant la resposta del checkpoint, que engloba l'aturada del cicle cel·lular i l'activació dels mecanismes adients de reparació. Si l'error és reparat la cèl·lula prossegueix el cicle. Si per contra, l'error no és corregit, els *checkpoints* indueixen la mort per apoptosi o la senescència replicativa.

Tradicionalment els *checkpoints* s'han dividit en quatre mecanismes de vigilància:

- Mecanisme de vigilància anterior a la replicació (transició G1/S). Avalua la capacitat de les cèl·lules de dur a terme i completar la replicació del genoma. Per fer-ho, monitoritza la mida cel·lular, la disposició de nutrients i de factors de creixement i, finalment, avalua el dany cel·lular i en el DNA.
- Mecanisme de vigilància durant el procés de replicació (fase S). Monitoritza el procés de síntesi del DNA testant activament l'estat del procés i preservant la integritat genòmica.
- Mecanisme de vigilància posterior a la replicació (fase G2). Avalua la correcta i total replicació del genoma. També determina la capacitat de la cèl·lula per completar el repartiment del cromosomes replicats i la duplicació cel·lular durant la mitosi.
- Mecanisme de vigilància de la divisió cel·lular (fase M). Controla la segregació equitativa dels cromosomes replicats en les cèl·lules filles, controlant la síntesi dels centròmers, la polimerització i la tensió del fus mitòtic i l'alineament dels cromosomes (Alberts et al., 1996).

L'activació d'aquests sistemes de control en condicions d'estrès cel·lular evita la presència de lesions en el DNA per a què no es fixin en el moment de la replicació, alhora que inhibeix la segregació mitòtica de cromosomes danyats en fase M. Les mutacions dels elements que intervenen en aquestes vies provoquen inestabilitat genòmica i són àmpliament representades en els càncers humans (Hartwell and Kastan, 1994).

3.1 Checkpoint de fase S

La fase S és un període crític del cicle cel·lular, ja que és el moment en què els cromosomes han de ser replicats amb la màxima fidelitat per preservar la informació genètica de les cèl·lules filles i en conseqüència la viabilitat cel·lular. A més, en cada cicle cel·lular el genoma només pot ser replicat una sola vegada. Per aquests motius requereix un alt grau de control. El DNA rep agressions constants que poden ser per causes endògenes, provocades pel propi metabolisme cel·lular on s'engloben oxidacions, desaminacions, hidròlisi espontània de bases, metilacions per les S-adenosilmetionines de bases o errors de la pròpia maquinària replicativa (De Bont and van Larebeke, 2004); com per causes exògenes, produïdes per exposicions a agents químics i físics que lesionen directament el DNA o que actuen

provocant estrès replicatiu per inhibició d'elements de la maquinària replicativa o per la depleció dels nivells de dNTP (Gale et al., 1987).

És crucial que les cèl·lules detectin i reparin aquests problemes abans que s'introdueixin mutacions en la seqüència de DNA durant el procés de la replicació produint mutacions puntuals i/o alteracions estructurals.

L'acumulació de mutacions genera inestabilitat genòmica, fenomen determinant en el procés de transformació i progressió maligna en càncers humans.

El *checkpoint* consta de tres nivells funcionals (Zhou and Elledge, 2000): molècules sensores que detecten l'estrès genotòxic i replicatiu, transductors centrals que integren les senyals que arriben dels sensors i direccionen la resposta, i les dianes que en última instància realitzaren la resposta del *checkpoint* de fase S.

Tot i aquesta classificació cal destacar que el mecanisme de manteniment de la integritat genòmica no presenta una organització tant jerarquitzada, ja que hi han proteïnes que es poden comportar simultàniament com molècules sensores i dianes.

Quan les cèl·lules entren en fase S i detecten lesions en el DNA, el *checkpoint* s'activa i genera la resposta que a grans trets engloba: la protecció de la replicació (Santocanale and Diffley, 1998), l'aturada del cicle cel·lular inhibint activament l'entrada en mitosi (Hartwell, 1992) i l'activació i coordinació dels sistemes de reparació (Hartwell, 1992).

Les cèl·lules que són deficientes en el mecanisme de *checkpoint* de fase S, en situacions d'estrès replicatiu no són capaces d'aturar el cicle cel·lular. Com a conseqüència, repliquen de manera incompleta el DNA. Entren en fase M generant mitosis aberrants, ja que cromosomes parcialment replicats són estirats pels centríols produint trencaments cromosòmics i generant així aneuploïdies (figura 6). En humans, l'aparició d'aneuploïdia dona lloc, per una banda, a una sèrie de patologies lligades a la pèrdua de viabilitat cel·lular. Per l'altra banda, la inestabilitat genòmica lligada a la pèrdua d'euploïdia és la base de la variabilitat genètica que, sota pressió selectiva, promou la transformació i la progressió tumoral.

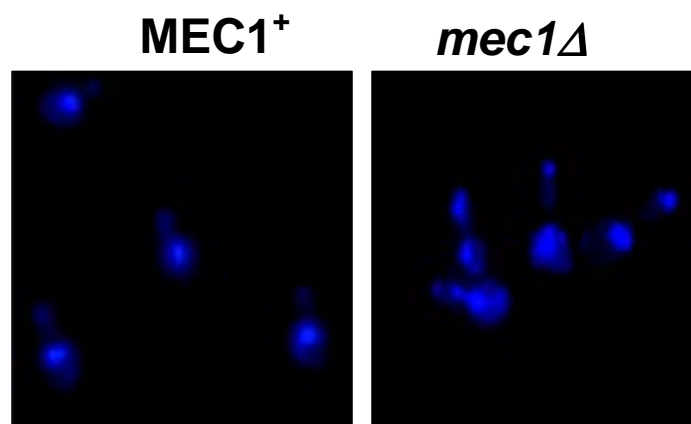


Figura 6. Imatges de microscopia de fluorescència on s'observa el DNA (DAPI) de dos cultius cel·lulars de *S.cerevisiae* després d'haver estat incubats 3 h en condicions d'estrès replicatiu. A l'esquerra es mostra una soca salvatge, on el *checkpoint* de fase S manté el cicle cel·lular aturat, només s'observa un nucli per cèl·lula. A la dreta, una soca deficient en la resposta del *checkpoint* per deleció del transductor central de la via. Aquestes cèl·lules no són capaces d'aturar el cicle, tot i no haver replicat el DNA, generant mitosis aberrants. Imatge pròpia.

Moltes de les proteïnes implicades en el *checkpoint* de fase S van ser identificades inicialment en els llevats de fissió i de gemmació, posteriorment s'han trobat les proteïnes o funcions homòlogues en vertebrats superiors. En la taula 1 es mostren les principals proteïnes implicades en el *checkpoint* de fase S en el llevat de gemmació i en humans.

3.2 Resposta del *checkpoint* de fase S

L'activació del *checkpoint* de fase S provoca la fosforilació i activació de les quinases efectores que, alhora, fosforilen diferents dianes generant la resposta del *checkpoint* de fase S que té com objectiu el manteniment de la integritat genòmica, preservant així la viabilitat cel·lular (Elledge, 1996).

La resposta és formada per: i) Protecció de la replicació, ii) Canvis en el patró d'expressió gènica, iii) Bloqueig del cicle cel·lular, iv) Recuperació o v) Apoptosi.

3.2.1 Protecció de la replicació

En activar-se el mecanisme de manteniment de la integritat genòmica és imprescindible que es protegeixi el procés de la replicació que ja ha començat.

Per protegir la replicació, el *checkpoint* actua a tres nivells:

Nivell funcional	Funció	<i>S. cerevisiae</i>	Humans
Sensors	Proteïnes RCF-like	Rad24	RAD17
		Rfc2-5	RFC2-5
	Proteïnes PCNA-like	Ddc1	RAD9
		Rad17	RAD1
		Mec3	HUS1
Estabilitzadors de les forquilles de replicació	Tof1	?	
Reconeixement de trencaments de doble cadena	Mre11	MRE11	
Adaptador	Estrès replicatiu	Mrc1	Claspín
	Dany al DNA	Rad9	BRCA1
Transductors centrals	Quinases ATR/ATM	Mec1	ATR
		Tel1	ATM
	Proteïnes d'interacció amb ATR	Dcd2	ATRIP
Efectors	Efectors quinasa	Rad53	CHK2
		Chk1	CHK1

Taula 1. Ortòlegs en *S.cerevisiae* i humans de les proteïnes implicades en el checkpoint de fase S. (Adaptada de (Gottifredi and Prives, 2005))

3.2.1.1 Estabilització de les forquilles de replicació

Quan les DNA polimerases detecten regions lesionades o es presenta un estrès replicatiu queden bloquejades i es desacoblen de les DNA helicases (MCM), aleshores es genera un excés de DNA de cadena senzilla (ssDNA) unit al complex proteic RPA (*Replication protein A*) que ajuda a estabilitzar-lo. El DNA de cadena senzilla és altament inestable i tendeix a trencar-se i formar intermediaris de recombinació de forma inespecífica generant estructures aberrants i irreversibles (Lopes et al., 2001; Sogo et al., 2002). Quan es produeix aquest fenomen per manca de l'acció del *checkpoint* de fase S s'indueix el col·lapse de les forquilles de replicació. El mecanisme de vigilància suprimeix la recombinació inhibint l'acció de proteïnes implicades en aquests processos que són reclutades a les forquilles aturades (Kai et al., 2005).

Per establir les forquilles, el *checkpoint* de fase S exerceix dues accions. Per una banda atura la DNA helicasa per evitar que continuï generant ssDNA (Byun et al., 2005; Ishimi et al., 2003). I per altra banda, fosforila les DNA polimerases i altres components del replisoma per a què es mantinguin associades a la cadena de nova síntesi (Cobb et al., 2003; Cobb et al., 2005; Lucca et al., 2004; Pellicoli et al., 1999), tant per protegir-la com per poder mantenir els complexos de replicació actius per reiniciar la replicació quan es superi la situació d'estrès (Desany et al., 1998; Enoch et al., 1992; Tercero et al., 2003).

3.2.1.2 Inactivació dels orígens de replicació tardans

Per evitar l'estancament de noves forquilles de replicació el *checkpoint* de fase S evita l'activació de nous orígens de replicació (Santocanale and Diffley, 1998). És conegut que l'acoblament del complex pre-RC amb els orígens de replicació es produeix durant la fase G1. El reclutament de CDC45 als orígens primerencs es dona quan la fase S és a punt de començar d'una manera dependent de l'acció CDK2 (Aparicio et al., 1999; Savitsky et al., 1995). Un cop s'han reclutat CDC45 i el complex RPA, l'origen de replicació es relaxa i això fa que la DNA polimerasa α iniciï la síntesi de la nova cadena (Walter and Newport, 2000; Zou and Stillman, 2000). Durant la progressió de la fase S, CDC45 és reclutat als orígens tardans (Aparicio et al., 1999). El *checkpoint* de fase S, a través de les quinases efectores inhibeix la fosfatasa activadora CDC25A marcant-la per la destrucció, reduint així l'activitat de CDK2, això fa que CDC45 no es pugui reclutar en els orígens tardans i com a conseqüència aquests quedin inhibits (Falck et al., 2002).

3.2.1.3 Remodelació de la cromatina

El DNA en les cèl·lules eucariotes es troba empaquetat formant la cromatina. El grau d'empaquetament afecta els processos de replicació, transcripció, reparació i recombinació (Ehrenhofer-Murray, 2004; Luger et al., 1997). La compactació de la cromatina és regulada per modificacions post-traduccionals de les histones fent que la cromatina estigui més compacte o més relaxada variant l'accessibilitat a diferents complexos [revisat a (Marmorstein, 2001; van Attikum and Gasser, 2005)].

El *checkpoint* fosforila la histona H2A que forma part del nucli d'histones que conformen el nucleosoma. Aquesta acció promou la localització de proteïnes implicades en la resposta del *checkpoint*, així com la remodelació de l'estat de compactació de la cromatina (Shim et al., 2007; Thiriet and Hayes, 2005).

L'activació del *checkpoint* en resposta a estrès replicatiu regula complexos de desacetilació d'histones a través d'un mecanisme desconegut. Les histones dels orígens de replicació tardans són desacetilades. Per tant, s'indueix la compactació de la cromatina ajudant a la inhibició d'aquests orígens de replicació (Aparicio et al., 2004). També s'ha demostrat que l'activació del *checkpoint* de fase S promou el control dels diferents complexos de remodelació de la cromatina Kap1 (*KRAP associated protein 1*), SWI/SNF (*Switch/sucrose nonfermentable*), INO80, NuA4 i RSC (*Chromatin structure remodeling*), provocant una reestructuració de la mateixa afavorint l'activació i inhibició de l'expressió de determinats gens (Lee and Workman, 2007).

3.2.2 Canvis en el patró d'expressió gènica

L'activació del *checkpoint* de fase S en *S. cerevisiae* produeix un canvi del patró en l'expressió gènica (Gasch et al., 2001; Huang et al., 1998). En resposta a la quinasa efectora Rad53p s'activen gens que estan implicats en la replicació i en diferents vies de reparació en funció del tipus de dany generat (Gasch et al., 2001). Es conegut que Rad53p activa per fosforilació la quinasa Dun1p (*DNA-damage uninducible 1*). Aquesta proteïna un cop activada regula la resposta del *checkpoint* a nivell transcripcional (Bashkirov et al., 2003; Chen et al., 2007).

En humans el mecanisme de control de la transcripció dependent de *checkpoint* encara no s'ha elucidat. L'activació transcripcional de les RNR (*Ribonucleotidil-N-reductase*) és l'exemple més estudiat (Huang et al., 1998; Zhou and Elledge, 1992; Zou and Elledge, 2003). Aquestes proteïnes són les encarregades de sintetitzar intermediaris per la síntesi de dNTP, i en conseqüència per la síntesi de les noves cadenes del DNA.

Existeixen drogues que inhibeixen les RNR produint una depleció dels nivells de dNTP i induint estrès replicatiu. El *checkpoint* de fase S indueix l'expressió dels gens que codifiquen les proteïnes d'aquest complex per tal de superar la crisi.

Recentment, s'ha demostrat en humans que el *checkpoint* reactiva la transcripció dependent d'E2F1 en una fase S pertorbada d'una manera independent de les quinases efectores CHK1 i CHK2 (Carcagno et al., 2009).

3.2.3 Bloqueig del cicle cel·lular

L'activació del mecanisme de manteniment de la integritat genòmica provoca l'aturada de la progressió del cicle cel·lular, per tal d'evitar la segregació de cromosomes parcialment replicats en cèl·lules filles durant la mitosi.

Aquest bloqueig es produeix a través de 2 nivells:

- Degradació de la fosfatasa CDC25A. Les quinases efectores CHK1 (Chk1 en llevat) com CHK2 (Rad53 en llevat) fosforilen la fosfatasa CDC25A promovent la seva ubiquitinació i degradació [Revisat en (Bartek and Lukas, 2003)]. Aquesta fosfatasa durant una fase S no pertorbada, desfosforila activament la subunitat CDK2 del complex ciclina-quinasa promovent l'activació del complex i la progressió de les cèl·lules al llarg del cicle cel·lular (Hoffmann et al., 1994). El *checkpoint* promou la degradació de la fosfatasa mantenint el complex ciclina-CDK inactiu i, en conseqüència, induint aturada de la fase S (Busino et al., 2003).

- Inhibició del complex APC. Com s'ha explicat anteriorment, el complex APC presenta dos adaptadors que actuen en diferents moments de la fase M. CDC20 regula la transició de metafase a anafase (Yamamoto et al., 1996). Quan s'activa degrada la securina, que inhibeix la separasa que permetrà la separació de les cromàtides germanes (Agarwal et al., 2003; Wang et al., 2000a). El *checkpoint* actua estabilitzant la securina i conseqüentment inhibint la separació de cromàtides (Clarke et al., 2001).

L'adaptador CDH1, que condueix la sortida de fase M, també és regulat pel *checkpoint* de fase S, tot i que de forma indirecta ja que activa el seu complex inhibidor MEN (*Mitotic exit network*) (Cheng et al., 1998; Hu et al., 2001).

3.2.4 Recuperació del *checkpoint* de fase S

Un cop les cèl·lules han superat un estrès genotòxic, és imprescindible que el *checkpoint* de fase S i la seva resposta quedin inactivades per poder completar el procés de la replicació i, en conseqüència, prosseguir el cicle cel·lular. Aquest procés rep el nom de recuperació del *checkpoint*. Tot i la importància crucial d'aquest fenomen el seu mecanisme és poc conegut.

En el llevat de gemmació, s'ha vist que la desactivació de la quinasa efectora Rad53 (CHK2 en humans) es correlaciona amb el seu retorn a la forma no fosforilada i no involucra

proteòlisi de la proteïna (Pellicoli et al., 1999; Tercero et al., 2003). Per aquest motiu es pensa que proteïnes amb activitat fosfatasa estan involucrades en aquest procés de recuperació. Les fosfatases de la família PP2C, Ptc2 i Ptc3, s'han mostrat necessàries per la desfosforilació de Rad53 després de lesions en el DNA de doble cadena (Guillemain et al., 2007; Leroy et al., 2003). L'ortòleg humà d'aquestes, Wip1/Ppm1d, desfosforila de forma directa CHK2 (Fujimoto et al., 2006). Recentment ha estat reportat que diferents fosfatases en *S. cerevisiae* són capaces de desfosforilar residus crítics de Rad53p indicant que existeix una redundància funcional alhora d'inhibir el *checkpoint* de fase S (Travesa et al., 2008).

3.2.5 Apoptosi

Quan no es pot superar la crisi replicativa que ha portat a l'activació del *checkpoint* de fase S, el mecanisme de supervivència induïx la mort programada de les cèl·lules afectades. p53, proteïna central en l'apoptosi, és una diana del *checkpoint*. Pot ser fosforilada directament pels transductors centrals ATR i ATM (Shiloh, 2001) i per les quinases efectors CHK1 i CHK2 (Hirao et al., 2002; Shieh et al., 2000; Shieh et al., 1999). La fosforilació de p53 i de la seva ubiquitina ligasa, MDM2, de manera dependent del *checkpoint* provoca la inhibició de la interacció d'ambdues proteïnes i, conseqüentment, l'acumulació de p53 (Prives and Hall, 1999; Shiloh, 2001), col·laborant en l'aturada del cicle cel·lular i, en últim cas, induint l'entrada en apoptosi (Pietenpol and Stewart, 2002).

3.3 *Checkpoint* de fase S en humans

El sistema de vigilància de la integritat genòmica en vertebrats superiors està format per dues rutes moleculars paral·leles: i) ATR/CHK1 i ii) ATM/CHK2. Aquestes vies s'activen per diferents lesions en el DNA durant la fase S, tot i que presenten una certa redundància funcional i fosforilen dianes comunes. L'activació d'ATR s'associa a trencaments de cadena senzilla de DNA i a les situacions d'estrès replicatiu, mentre que la d'ATM es relaciona amb la detecció de trencaments de doble cadena de DNA. La via d'ATR presenta una activitat major durant la fase S (Bao et al., 2004; Heffernan et al., 2002).

3.3.1 Activació del *checkpoint* de fase S

El *checkpoint* presenta una sèrie d'elements que es troben englobats en tres categories, les molècules sensores, els transductors centrals amb les seves quinases efectores i per últim les molècules diana.

En situacions on es produeix estrès genotòxic o replicatiu s'activa la ruta molecular:

3.3.1.1 Senyals d'activació

El *checkpoint* de fase S es pot activar per diferents estímuls, però tots requereixen el funcionament de la maquinària replicativa:

a) Diferents tipus de lesions en el DNA, són reconegudes per diferents sets de proteïnes capaces d'activar el *checkpoint* (Carr, 2003; Rouse and Jackson, 2002a). L'intermediari comú en moltes d'aquestes lesions és el ssDNA unit al complex proteic RPA. Aquest complex s'uneix al ssDNA ja que és altament inestable i tendeix a formar estructures recombinogèniques. Per tant, el complex RPA té la funció d'estabilitzar i protegir el DNA de cadena senzilla (Alani et al., 1992). Els alts nivells d'aquest complex provoquen l'activació de la via d'ATR del *checkpoint* (Zou and Elledge, 2003).

Les lesions en el DNA provoquen un bloqueig de la progressió de les DNA polimerases produint un desacoblament amb la DNA helicasa formada pel complex MCM que continuarà separant les cadenes de DNA generant un excés de ssDNA-RPA. S'ha observat que la quantitat necessària ssDNA unit a RPA per a què es produeixi l'activació del *checkpoint* en eucariotes superiors és de 500 parells de bases (Sogo et al., 2002). En el cas de trencaments de DNA de doble cadena produïts per agents ionitzants són reconeguts directament per la via d'ATM activant el *checkpoint* de fase S (Rouse and Jackson, 2002b).

b) Estrès replicatiu. En aquest cas no s'han generat lesions en el DNA, sinó que es produeix una inhibició de la maquinària replicativa o una manca d'intermediaris de la replicació.

L'estrès replicatiu també genera un desacoblament de les funcions DNA polimerasa i helicasa generant un excés del complex ssDNA-RPA que, conseqüentment, indueix l'activació de la via d'ATR. L'estrès replicatiu pot ser generat per diferents drogues, per exemple, per la hidroxiaurea (HU). Aquesta molècula inhibeix les Ribonucleotidilreductases (RNR) que formen el complex enzimàtic encarregat de la síntesi dels dNDP, intermediaris en

la síntesi dels dNTP. Quan les DNA polimerases no tenen bases que introduir en la cadena de nova síntesi queden estancades, és a dir, no poden progressar. Un altre agent químic que indueix estrès replicatiu és l'afidicolina que inhibeix directament les DNA polimerases (Krokan et al., 1981).

3.3.1.2 Complexos sensors.

Per l'activació del *checkpoint* de fase S és necessari que les proteïnes sensores de la ruta detectin els senyals activadors i enviïn senyals d'emergència als transductors centrals de la via que, un cop reclutats a les regions de dany, coordinen i dirigeixen la resposta del *checkpoint*.

Els sensors del mecanisme de manteniment de la integritat genòmica humà són:

3.3.1.2.1 Complex 9-1-1/complex RAD17

El complex 9-1-1 és format per tres proteïnes, Rad9 (*Radiation sensitivity protein 9*), Hus1 i Rad1 (*Radiation sensitivity protein 1*). Aquestes formen una estructura en forma d'anell que guarda similituds estructurals i funcionals amb PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) (Griffith et al., 2002; Lindsey-Boltz et al., 2001; Thelen et al., 1999; Venclovas and Thelen, 2000). PCNA és un complex homotrímer que encercla la cadena de DNA i s'uneix a la DNA polimerasa δ , incrementant la seva processivitat (Krishna et al., 1994).

El complex anomenat factor de replicació C (RFC) format per les subunitats 1-5, s'encarrega d'obrir i carregar en el DNA el complex PCNA (Tsurimoto and Stillman, 1991). RAD17 (*Radiation sensitivity protein 7*), per la seva banda, guarda similitud amb la subunitat gran del factor 1 de replicació C (RFC1) i com aquesta, interacciona amb les subunitats petites RFC2-5 (Green et al., 2000). En condicions d'estrès replicatiu i genotòxic, RAD17-RFC interacciona amb ssDNA-RPA (Kim and Brill, 2003), reclutant el complex 9-1-1 a les regions de transició ssDNA/dsDNA (Lindsey-Boltz et al., 2001). El complex RAD17-RFC obre l'estructura en anell del complex 9-1-1 i el carrega en el DNA (Melo and Toczyski, 2002) (figura 7). Sembla que el complex 9-1-1 té la funció addicional de processar les regions danyades incrementant la quantitat de ssDNA, amplificant així la senyalització per reclutar altres proteïnes implicades en la resposta del *checkpoint* de fase S (Marini et al., 1997; Parker et al., 1998). Aquests complexos ajuden a estimular l'activitat quinasa del transductor central ATR.

3.3.1.2.2 Complex MRN

És un complex format per les proteïnes MRE11 (*meiotic recombination 11 homolog A*), RAD50 i NBS1 (*Nijmegen breakage syndrome 1*). Aquest complex presenta activitat nucleasa i juga un paper fonamental en la senyalització, processament i reparació de trencaments de doble cadena de DNA (D'Amours and Jackson, 2002). Per aquest motiu se li poden atribuir funcions sensores i de diana del *checkpoint* de fase S, majoritàriament de la via d'ATM (Olson et al., 2007).

El complex MRN és reclutat a les regions de trencaments de doble cadena i ajuda a la incorporació dels monòmers actius d'ATM en aquestes regions (Lisby et al., 2004; van den Bosch et al., 2003) (figura 8). Quan els monòmers d'ATM arriben a les regions de la lesió fosforilen el complex MRN i activen l'activitat nucleasa del complex, que alhora genera regions ssDNA que activaran la via d'ATR (Merrick et al., 2004; Shechter et al., 2004). D'aquesta manera les dues vies del *checkpoint* de fase S col·laboren en la senyalització i reparació de trencaments de doble cadena de DNA.

3.3.1.3 Transductors centrals

Els transductors centrals del *checkpoint* de fase S són les proteïnes de la família fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), ATR i ATM en eucariotes superiors (Abraham, 2001). Aquestes proteïnes són Ser/Thr quinases que s'activen en resposta a diferents tipus d'estrès iniciant la cascada de senyalització i generant la resposta del *checkpoint* de fase S. Els membres d'aquesta família queden completats amb les DNA-PK, que reconeixen i senyalitzen lesions de doble cadena i estan implicades en la reparació d'extremes no homòlegs (Anderson and Lees-Miller, 1992). Aquestes quinases són altament conservades al llarg de l'evolució (veure taula 1). ATR i ATM reconeixen i fosforilen la seqüència S/T-Q de les seves dianes (Abraham, 2004).

3.3.1.3.1 ATR (*Atàxia Telangiectasia and Rad3-related protein*)

Aquest membre de les PI3K respon a un gran número de lesions en el DNA i estrès replicatiu quan es generen vastes regions de ssDNA. ATR sempre forma heterodímers amb ATRIP (*ATR-interacting protein*) que és la seva subunitat reguladora (Cortez et al., 2001) i l'encarregada de la interacció amb el complex ssDNA-RPA (Zou and Elledge, 2003).

El complex ATR-ATRIP es localitza i s'uneix a les estructures formades per ssDNA-RPA d'una manera independent a d'altres factors del *checkpoint* de fase S (Rouse and Jackson, 2002b;

Zou and Elledge, 2003). Un cop localitzada, ATR s'autofosforila amb l'ajut dels complexos Rad17/9-1-1 activant-se. Aleshores fosforila el seu efector quinasa CHK1 que s'encarrega d'amplificar i propagar la senyal generant la resposta del *checkpoint* de fase S (Pellicioli et al., 1999) (figura 7). Cal destacar que ATR és una proteïna essencial, la seva deleció produeix la mort cel·lular (Osborn et al., 2002). Aquest fet és atribuït a què la via ATR/CHK1 controla l'activació dels orígens de replicació i la progressió de les forquilles durant una fase S no pertorbada (Petermann et al., 2006; Shirahige et al., 1998).

3.3.1.3.2 ATM (Atàxia Telangiectasia Mutated protein)

Aquesta proteïna va ser aïllada de pacients afectats pel síndrome atàxia telangiectàsia. Aquestes persones presenten mutacions en els dos al·lels que codifiquen per la proteïna. Com a conseqüència són hipersensibles a les radiacions ionitzants ja que les seves cèl·lules són incapaces de generar una resposta eficaç contra l'estrès genotòxic.

Com ja s'ha comentat, l'element desencadenant de l'activació i senyalització de la ruta regulada per ATM és la presència de lesions de doble cadena (Shiloh, 2001). En una fase S no pertorbada, ATM forma homodímers inactius (Bakkenist and Kastan, 2003). Quan en fase S es detecten trencaments de doble cadena, els dímers d'ATM s'autofosforilen i es separen (Bakkenist and Kastan, 2003). ATM es reclutada a les zones lesionades i fosforila els seus efectors i dianes (Mirzoeva and Petrini, 2003) (figura 8). L'efector quinasa principal de la via és CHK2 que s'hiperfosforila de manera dependent d'ATM i propaga la senyal generant la resposta del *checkpoint*.

3.3.1.4 Adaptadors

L'activació de qualsevol de les dues vies en resposta als seus respectius estímuls provoca el reclutament i fosforilació de diferents proteïnes implicades en la resposta del *checkpoint* de fase S. Destaca la importància de l'activació dels efectors quinasa principals. L'activació d'aquests, així com d'altres dianes d'ATR i ATM requereix la col·laboració de les proteïnes adaptadores CLSPN i BRCA1. En la via d'ATR el reclutament d'aquests adaptadors a les regions de dany és afavorit per l'acció del complex sensor RAD17/9-1-1 (Majka et al., 2006; Parrilla-Castellar et al., 2004).

3.3.1.4.1 CLSPN (Claspina)

Aquesta proteïna és altament conservada al llarg de l'evolució (taula 1). En resposta a dany i estrès replicatiu CLSPN es fosforila de manera dependent d'ATR, provocant el seu reclutament a les zones de lesió. En aquestes condicions CLSPN interaccionen amb CHK1 col·laborant de forma directa en la seva fosforilació per part d'ATR, per tant CLSPN fa de mediador entre ATR i CHK1 (Lin et al., 2004) (figura 7). Per altra banda, s'ha observat que CLSPN té funcions en la fase S no pertorbada. Interacciona amb la cromatina un cop s'ha ensemblat el complex pre-RC (Brondello et al., 2007), on interacciona amb el complex PCNA; per aquest motiu s'ha postulat la seva participació en el monitoratge de la integritat de les forquilles de replicació (Lee et al., 2003).

3.3.1.4.2 BRCA1 (*Breast cancer 1*)

BRCA1 s'ha relacionat amb Rad9p de *S. cerevisiae* malgrat que no presenten una homologia clara, tot i això totes dues posseeixen dominis BRCT que semblen crucials per l'activació del *checkpoint* de fase S. Les quinases ATR i ATM la fosforilen en resposta a dany. Aleshores BRCA1 col·labora en la fosforilació d'algunes de les seves dianes com CHK1 i CHK2 (figures 7 i 8) o d'altres dianes comunes com p53 (Foray et al., 2003; Lin et al., 2004). Un cop que les proteïnes dianes són fosforilades es produeix el trencament de la seva interacció amb BRCA1 (Gilbert et al., 2001). En mamífers BRCA1 actua en un complex multiproteic anomenat BASC (*BRCA1-associated genome surveillance complex*) format per una gran quantitat de proteïnes relacionades amb diferents sistemes de reparació. Aquest complex té una importància central en la reparació de trencaments de doble cadena (Wang et al., 2000b).

3.3.1.5 Quinases efectores

Dos efectors Ser/Thr quinasa, CHK1 i CHK2, juguen un paper crucial en la resposta del *checkpoint* de fase S fosforilant un elevat número de substrats. S'ha demostrat que el domini conservat de fosforilació de les dues quinases és R-X-X-S/T (O'Neill et al., 2002). Aquestes proteïnes són altament conservades al llarg de l'evolució (Melo and Toczyski, 2002). Malgrat que aquestes proteïnes presenten diferències en els seus dominis fosforilen un elevat número de substrats comuns (Bartek and Lukas, 2003).

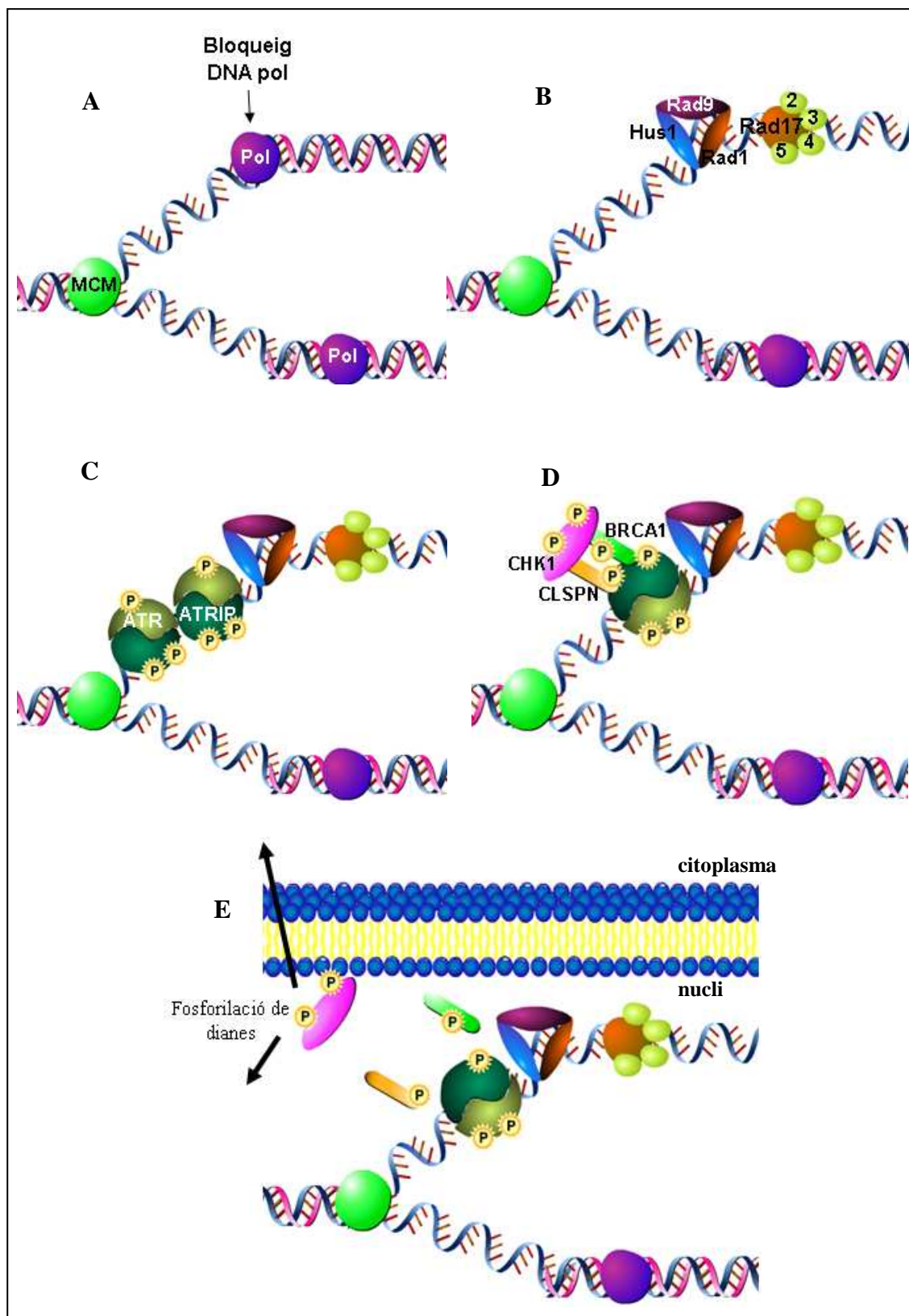


Figura 7. Etapes d'activació de la via d'ATR/CHK1. (A) La DNA polimerasa i la helicasa es desacoblen generant-se excés de ssDNA. (B) Els complexos Rad17/9-1-1 interaccionen amb el lloc de la lesió. (C) Els heterodímers ATR-ATRIP són reclutats a les regions de dany i ATR s'autofosforila en trans. (D) ATR fosforila CHK1 amb l'ajut dels adaptadors. (E) CHK1 fosforilat actuarà sobre les seves dianes generant la resposta del checkpoint de fase S.

3.3.1.5.1 CHK1 (*Checkpoint kinase 1*)

En eucariotes superiors la via preferent d'activació en el *checkpoint* de fase S és la regulada per ATR, per tant CHK1 és l'efector clau. Com ja s'ha explicat anteriorment, quan es produeix ssDNA en quantitats elevades ATR s'activa amb l'ajut del complex Rad17/9-1-1, amb la col·laboració de les proteïnes adaptadores fosforila CHK1 que propagarà i dirigirà la resposta del *checkpoint* fosforilant substrats solubles (Kumagai and Dunphy, 2003; Weiss et al., 2002; Zou et al., 2002) (figura 7). CHK1 és fosforilat en dos residus serina per ATR, el residu Ser345 que és el responsable de localitzar la proteïna al nucli i de la seva activació (Jiang et al., 2003) i Ser317 que potencia la funció quinasa.

Durant una fase S pertorbada CHK1 promou la competència de la replicació, és a dir, adapta la maquinària replicativa a una taxa de processivitat molt baixa evitant així que es dissociï del DNA. Això té un paper molt important en la recuperació de la replicació un cop s'ha superat la situació d'estrès (Osborn et al., 2002).

3.3.1.5.2 CHK2 (*Checkpoint kinase 2*)

En eucariotes superiors CHK2 és majoritàriament activat de manera dependent d'ATM en resposta a trencaments de doble cadena (Falck et al., 2001; Falck et al., 2002). ATM fosforila CHK2 amb la col·laboració de BRCA1, això provoca que CHK2 formi homodímers a través dels dominis FHA i de què s'autohiperfosforilin en trans per activar totalment la proteïna, és a dir, que una proteïna de CHK2 fosforila a l'altre i viceversa. Els homodímers activats viatgen al llarg del nucleoplasma amplificant la senyal i generant la resposta del *checkpoint* (figura 8). CHK2 presenta en l'extrem N-terminal una regió rica en motius SQ/TQ anomenada SCD (SQ/TQ *cluster domain*) on ATM pot fosforilar diferents residus per activar la quinasa efectora, tot i que té especial predilecció per la Thr68 (Aktas et al., 2002; Dong et al., 2003).

3.4 *Checkpoint de fase S en S. cerevisiae*

Com ja s'ha mencionat anteriorment, el *checkpoint* de fase S és molt conservat al llarg de l'evolució, des de llevats a eucariotes superiors es troben conservats tots els components i complexos que han estat explicats prèviament (taula 1).

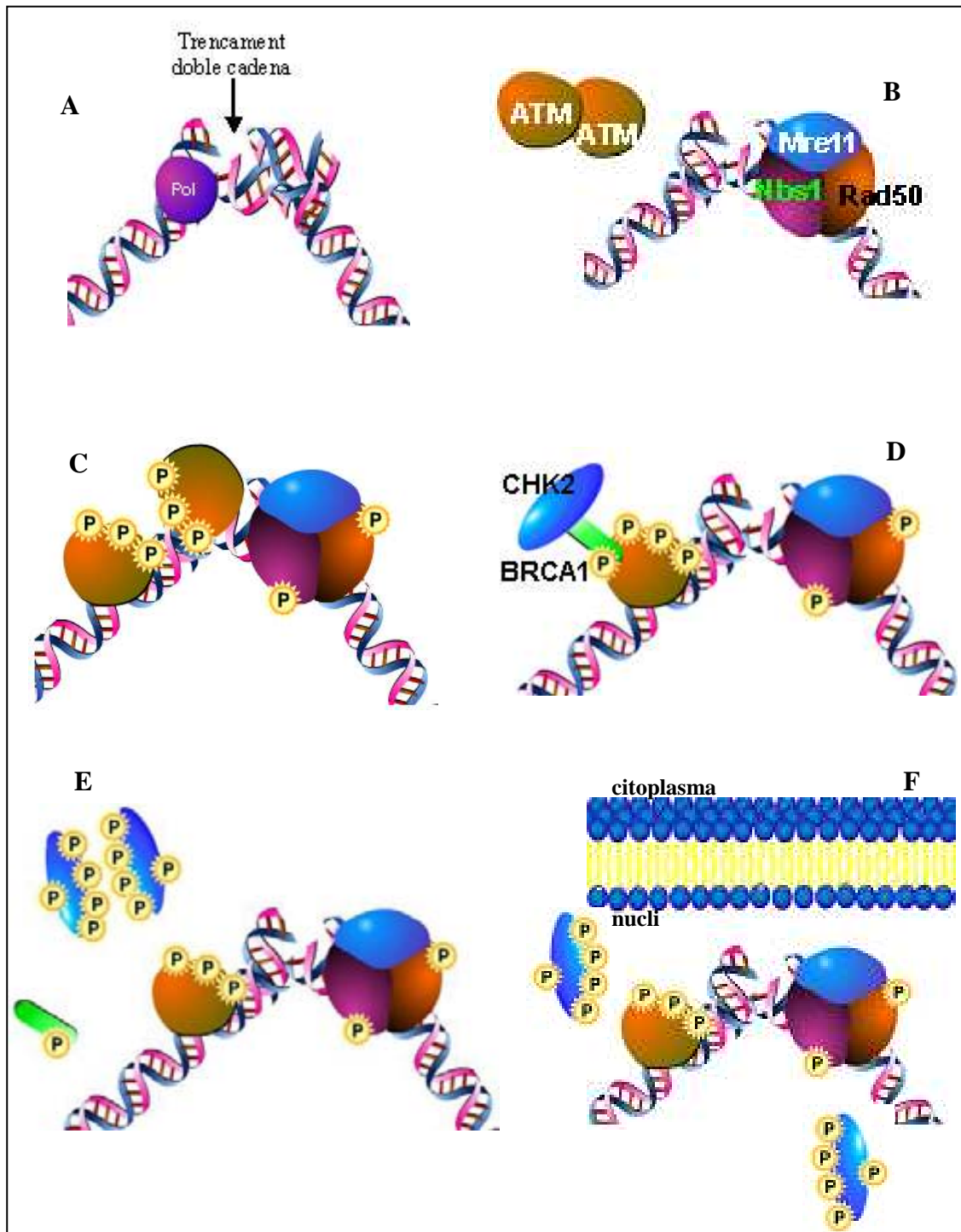


Figura 8. Activació de la via ATM/CHK2. (A) La DNA polimerasa es bloqueja perquè arriba a una regió de trencament de doble cadena. (B) El complex MRN interacciona amb la regió danyada. Els homodímers ATM arriben a la regió de la lesió. (C) ATM s'autofosforilen en trans i esdevenen monòmers actius. (D) ATM amb ajut de BRCA1 fosforila a CHK2. (E) CHK2 s'hiperfosforila en trans amb altres monòmers de CHK2 i esdevé completament actiu. (F) CHK2 actiu amplifica la senyal i genera la resposta del checkpoint de fase S.

Part de la feina realitzada en el present estudi es va fer utilitzant *S. cerevisiae* com a model. A continuació s'explicaran algunes diferències en el seu mecanisme de manteniment de la integritat genòmica.

Els transductors centrals en llevat són Mec1p (ATR) i Telp1 (ATM). Tot i això, Mec1p és la principal quinasa transductora del *checkpoint* de la fase S. S'activa tant en resposta a la detecció d'excés de ssDNA com a trencaments de doble cadena (Naiki et al., 2004).

En canvi, Tel1p té un paper poc clar en la resposta a estrès genotòxic (Morrow et al., 1995; Naiki et al., 2000; Sanchez et al., 1996).

Mentre ATM en humans té un paper clau en la resposta de trencaments de doble cadena, Tel1 té un paper secundari, sembla que només respon a trencaments de doble cadena en absència de Mec1p (Usui et al., 2001). L'altra diferència important que es troba en el *checkpoint* de fase S del llevat de gemmació és a nivell dels efectors quinasa, Chk1p (CHK1) i Rad53p (CHK2). En llevat l'efector quinasa principal del transductor Mec1p (ATR) és Rad53p al llarg de tots els *checkpoints* del cicle cel·lular (Sanchez et al., 1996), per tant Rad53p integra les funcions assignades a CHK1 en el *checkpoint* de fase S en cèl·lules humanes. Aquesta proteïna també és activada per acció de Tel1 en resposta a trencaments de doble cadena, només en absència de Mec1p (Nyberg et al., 2002).

En llevat, Chk1p actua sobretot en el *checkpoint* de G2/M (Gardner et al., 1999; Sanchez et al., 1999).

3.5 Mecanisme de vigilància de la fase S en càncer

El mecanisme de manteniment de la integritat genòmica manté l'estabilitat genètica de les cèl·lules. Quan es detecta dany en el DNA s'activa i genera la resposta del *checkpoint*, que té com a finalitat evitar la fixació de mutacions, la posterior inestabilitat genòmica i en un últim pas la transformació maligna tumoral.

Les majors fonts que contribueixen al desenvolupament tumorogènic en humans són tant les agressions exògenes com endògenes, a les quals respon el *checkpoint* de fase S. Per tant, és raonable especular que alteracions en elements d'aquest mecanisme augmenten el risc de desenvolupar càncers. De fet és conegut que mutacions germinals en diferents proteïnes sensores, transductores i dianes provoquen síndromes familiars amb un alt risc de desenvolupar processos tumorals. A la taula 2 es pot veure un sumari de les més estudiades.

A més, un gran número de mutacions en proteïnes del *checkpoint* també s'ha estat associat al desenvolupament de tumors d'origen espontani, com per exemple les mutacions d'ATR i CHK1 en càncer colorrectal amb inestabilitat de microsatèl·lits (Menoyo et al., 2001) o mutacions en p53 en més del 50% dels càncers.

D'altra banda, l'estudi del mecanisme de vigilància de la integritat genòmica també és molt interessant des del punt de vista de la teràpia antitumoral. Ja que moltes de les molècules utilitzades tant en quimioteràpia com la radioteràpia actuant directament sobre el DNA o el procés de la replicació. Si les cèl·lules malignes presenten el *checkpoint* intacte poden induir resistències als tractaments, ja que generaran respostes efectives contra l'acció de la molècula. Actualment s'estudien formes de sensibilitzar aquestes cèl·lules tumorals alterant aquest mecanisme (Dai and Grant, 2010).

Proteïna	Funció	Malaltia
ATM	Transductor Central	Atàxia telangiectàsia
ATR	Transductor Central	Síndrome de Seckel
CHK2	Quinasa efectora	Síndrome de Li-Fraumeni
NBS1	Sensor	Síndrome de Nijmegen
MRE11	Sensor	Síndrome similar Atàxia telangiectàsia
BRCA1	Adaptador	Càncer de mama i ovaris
P53	Efector	Síndrome Li-Fraumeni

Taula 2. Proteïnes implicades en el *checkpoint* de fase S en cèl·lules humanes i síndromes o processos tumorals als quals s'associen les seves mutacions. (Adaptada de (Nyberg et al., 2002).

4. Inhibidors de la topoisomera I

La camptotecina és un alcaloide quinolina que inhibeix selectivament la DNA topoisomerasa I, impedit que la doble hèlix del DNA pugui ser relaxada del alt grau d'enrotllament durant els processos de replicació i la transcripció. La topoisomerasa I per relaxar el DNA produeix trencaments de cadena simple i permet que una cadena de DNA giri sobre l'altra.

Aquest agent presenta una gran eficàcia en el tractament d'un elevat número de càncers, fent que sigui una de les molècules més utilitzades en quimioteràpia, destacant en el tractament de tumors colorrectals.

Va ser descoberta al 1966 per M. E. Wall, M. C. Wani i col·laboradors en un estudi a gran escala on s'analitzaven productes naturals amb activitat antitumoral (Wall et al., 1966).

La camptotecina s'uneix a les cadenes del DNA i la topoisomerasa I mitjançant ponts d'hidrogen, generant d'aquesta manera complexos estables. Durant la fase S les forquilles de replicació xoquen amb aquests complexos produint trencaments en el DNA de doble cadena (Hsiang et al., 1989; Ryan et al., 1991; Shin and Snapka, 1990). El mateix fenomen es produït durant totes les fases del cicle cel·lular per la maquinària de transcripció (Huang et al., 2010). Aquest fet provoca un alentiment de la replicació que porta a l'activació del *checkpoint* de fase S, a través de la via d'ATR/CHK1 (Cliby et al., 2002; Wang et al., 2002a; Wang et al., 2002b), i també l'activació de la via ATM/CHK2 (Pommier et al., 2006b; Takemura et al., 2006).

El potencial anticàncer de la camptotecina es troba estretament relacionat amb els defectes específics de les cèl·lules tumorals en el *checkpoint* de fase S [revisat a (Pommier et al., 2006a)], és a dir, que si les cèl·lules d'un tumor presenten el *checkpoint* de fase S intacte seran més resistents al tractament perquè podran respondre a les agressions induïdes per la droga, ja que seran capaces d'aturar el cicle cel·lular i activaran els mecanismes de reparació necessaris. Mentre que els tumors que presentin cèl·lules amb defectes en el *checkpoint*, seran més sensibles al quimioteràpic ja que no podran respondre als trencaments de cadena simple i doble de DNA induïts per la camptotecina.

S'han relacionat mutacions d'un elevat número de factors implicats en la resposta del *checkpoint* de fase S amb la sensibilitat al quimioteràpic, per exemple mutacions en ATM (Smith et al., 1989), ATR (Cliby et al., 2002), CHK1 (Wang et al., 2002b), CHK2 (Yu et al., 2001), BRCA1 (Fedier et al., 2003), p53 (Gupta et al., 1997), NBS1 (Kraakman-van der Zwet et al., 1999), etc...

L'irinotecan és un anàleg sintètic de la camptotecina àmpliament utilitzat en el tractament del càncer colorrectal (Cunningham et al., 2004). Degut a la seva millor solubilització en aigua i a una menor toxicitat és la molècula utilitzada en clínica, en detriment de la camptotecina. Tot i que el seu mecanisme d'acció és idèntic al de la molècula original (Rajkumar and Adjei, 1998).

A pesar de ser un dels quimioteràpics preferents en el tractament del càncer colorrectal, presenta una taxa de resposta del 30% quan es dona com tractament únic i fins un 50% en combinació amb altres fàrmacs (Douillard et al., 2000; Saltz et al., 2000). Aquest fet fa imprescindible el descobriment de biomarcadors predictius de la seva resposta que

permetin generar teràpies personalitzades i més eficaces en funció del fons mutacional de cada càncer.

Motiu de la tesi

“L’experimentador que no sap el que està buscant no comprendrà el que troba”

Claude Bernard (Fisiòleg)

L'estudi de les vies de senyalització implicades en el desenvolupament tumorogènic és crucial per poder entendre millor el context de la malaltia.

Per aquest motiu l'objectiu d'aquesta tesi ha estat la identificació de noves proteïnes implicades en la resposta del *checkpoint* de fase S per relacionar-les, posteriorment amb el desenvolupament dels processos tumorals i les seves implicacions en la modulació de la resposta quimioteràutica.

El mecanisme de supervivència de la fase S constitueix una barrera anticàncer, ja que és la ruta de senyalització encarregada de monitoritzar el procés de replicació dels cromosomes per tal d'evitar la fixació de mutacions. Aquest sistema quan detecta situacions que posen en perill la integritat genòmica de la cèl·lula, s'activa i genera la resposta del *checkpoint* que engloba estabilització de la replicació, aturada del cicle cel·lular, activació i coordinació dels sistemes de reparació del DNA i, en última instància, si la crisi no es superada marca l'entrada en apoptosi. Per aquest motiu, la mutació d'elements que intervenen en aquest sistema ha estat àmpliament implicada en tumors primaris humans, ja que afavoreixen la generació d'inestabilitat genòmica, un dels motors de la transformació maligna cel·lular (Hartwell, 1992).

L'estat funcional del *checkpoint* de fase S, afecta a la resposta en el tractament quimioteràpic dels pacients afectats, sobretot envers aquells agents que afecten directament l'estructura del DNA o el procés de la replicació (Hartwell and Kastan, 1994). Per tant, la mutació d'elements implicats en la resposta del *checkpoint* de fase S ajuden a sensibilitzar les cèl·lules malignes enfront aquests tipus de fàrmacs com poden ser agents intercalants, inhibidors de topoisomereses, quelants de dNTP... ja que les cèl·lules no són capaces de respondre a l'estrès genotòxic o replicatiu que provoquen (Gabai et al., 2008; Luo and Levenson, 2005). Tot i això no hi han publicacions a la literatura del paper que poden produir mutacions que augmentin el nivell de resposta del *checkpoint* de fase S, com poden ser sobreexpressions o activacions post-traduccionals constitutives de proteïnes implicades.

Objectius

“Les idees no duren massa. S’ha de fer alguna cosa amb elles”

Santiago Ramón y Cajal (Metge)

L'objectiu general d'aquesta tesi ha estat la identificació de noves proteïnes implicades en el cicle cel·lular com a noves dianes de la resposta del mecanisme de supervivència de la fase S.

Els objectius concrets són:

1. Identificació de noves dianes del *checkpoint* de fase S, a través de dos estratègies a gran escala:

- Aproximació proteòmica a partir d'un 2D-DIGE utilitzant com a model cultius de *S. cerevisiae*.
- Aproximació de biologia molecular a partir de microxips d'expressió en cèl·lules HeLa.

2. Confirmació individual del candidat d'interès.

3. Estudiar la implicació del candidat en el desenvolupament dels tumors colorrectals.

4. Estudiar la implicació de la nova diana del *checkpoint* en la resposta quimioteràpica a inhibidors de topoisomerasa I.

Material i Mètodes

*“L’únic camí per saber si els plans són bons o dolents és posar-los en
pràctica”*

Harold Lamb (Historiador)

1. TÈCNiques EN *Saccharomyces cerevisiae*

1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

El llevat *S. cerevisiae* és un organisme eucariota unicel·lular que és molt utilitzat com a model experimental, degut a què els diferents aspectes de la seva biologia faciliten els estudis genètics i de cicle cel·lular.

Té un genoma 200 vegades menor que el de les cèl·lules dels eucariotes superiors.

Aquest microorganisme presenta reproducció vegetativa i sexual. En la vegetativa el llevat es divideix per gemmació: la cèl·lula filla inicia el seu creixement a partir d'una gemma formada a partir de la cèl·lula mare on es produeix posteriorment la divisió nuclear i la separació cel·lular. Aquest cicle es pot produir tant en cèl·lules haploides com en diploides (Prigle et al., 1993). En els estudis genètics la utilització de cèl·lules haploides permet l'aïllament de mutants recessius, ja que el fenotip és un reflex directe del genotip.

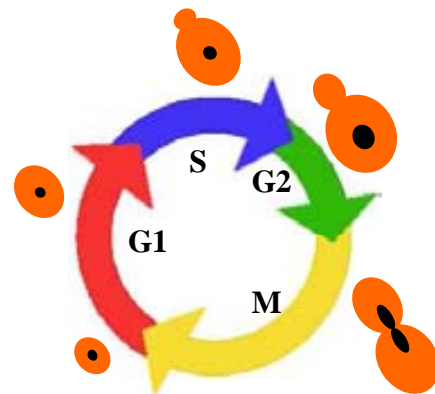


Figura 9. Variació de la morfologia de *S. cerevisiae* al llarg de les diferents fases del cicle cel·lular.

En el seu cicle sexual, *S. cerevisiae* presenta dos tipus sexuals haploides, "a" i "α", determinats per un parell d'al·lels heterozigots anomenats *MATa* i *MATα*. Quan es barregen en un cultiu cèl·lules haploides *MATa* i *MATα* es conjuguen donant lloc a cèl·lules diploides *MATa/MATα*. Aquestes es poden mantenir com a tal o poden esporular meiotícament, formant cèl·lules haploides d'ambdós sexes. Per promoure l'acoblament, les cèl·lules "a" i "α" generen respectivament les feromones factor "a" i factor "α", que aturen les cèl·lules del sexe contrari al final de la fase G1, és a dir, amb la dotació haploide completa, de manera que la fusió dóna lloc a una cèl·lula diploide. Aquestes feromones són molt útils per la sincronització de cultius al laboratori. En aquest estudi s'ha treballat amb cèl·lules haploides del tipus "a", la qual cosa permet sincronitzar-les a final de la fase G1 amb el factor α.

Una altra característica que fa del llevat de gemmació un organisme òptim per portar a terme estudis genètics és la seva facilitat de transformació, és a dir, la introducció de DNA exogen. A més, *S. cerevisiae* afavoreix la integració de DNA exogen ja que presenta una elevada taxa de recombinació homòloga, facilitant la deleció o modificació de gens d'interès.

El cicle cel·lular del llevat de gemmació dura aproximadament 2 hores, d'aquesta manera s'aconsegueixen elevades concentracions de cèl·lules en temps curts si es compara amb els cultius d'eucariotes superiors.

S. cerevisiae és molt utilitzat com a model per estudiar el cicle cel·lular, això es degut a què les vies implicades en el seu control són altament conservades al llarg de l'evolució i, alhora, simplificades en relació als eucariotes superiors. Un altre tret interessant del cicle cel·lular de *S. cerevisiae* és que la morfologia varia al llarg de les quatre fases del cicle en funció de la presència/absència i mida de la gemma (Figura 9), això permet veure *in situ* en quina fase del cicle es troben les cèl·lules d'un cultiu.

Les soques de llevat utilitzades en l'estudi i el seu fons genètic es troba resumit a la taula 3.

Es va fer un estudi a gran escala per identificar noves dianes del *checkpoint* de fase S a partir de la tècnica proteòmica 2D-DIGE (*Bidimensional Differential In-Gel Electrophoresis*). Degut a l'elevada complexitat del proteoma humà i la dificultat per resoldre'l es va decidir utilitzar *S. cerevisiae* com a model.

1.2 Medis de cultiu

- Líquids
 - YPD (Medi ric): 1% (p/v) d'extracte de llevat; 2% (p/v) de peptona; 2% (p/v) Dextrosa (glucosa).

- Sòlids
 - YPD (Medi ric): 1% (p/v) d'extracte de llevat; 2% (p/v) de peptona; 2% (p/v) Dextrosa (glucosa); 2% (p/v) d'agar.
 - SD (Medi mínim): 0,67% (p/v) de font de nitrogen de llevat; 2% (p/v) de dextrosa (glucosa); 2% (p/v) d'agar i els nutrients: 40 µg/ml d'adenina; 40 µg/ml de triptòfan; 80 µg/ml de leucina; 40 µg/ml d'histidina i 40 µg/ml d'uracil. Depenent del cas no s'afegí uracil o leucina (veure 1.4.1 i 1.4.2).

1.3 Soques

Soques	Fons genètic
W303-1a (Soca parental)	Mat-a <i>ura3-1 ade2-1 leu2-3,112 his3-11 trp1-2 can1-100</i>
Salvatge pel <i>checkpoint</i> de fase S	W303-1a Mat-a <i>ura3-1 ade2-1 leu2-3,112 his3-11 trp1-2 can1-100 sml1Δ</i>
Deficient en <i>checkpoint</i> de fase S	W303-1a Mat-a <i>ura3-1 ade2-1 leu2-3 his3-11 trp1-2 can1-100 sml1Δ mec1Δ::URA3</i>
Salvatge pel <i>checkpoint</i> de fase S amb SMC2 etiquetat	W303-1a Mat-a <i>ura3-1 ade2-1 leu2-3,112 his3-11 trp1-2 can1-100 sml1Δ smc2-3xHA (LEU2)</i>
Deficient en <i>checkpoint</i> de fase S amb SMC2 etiquetat	W303-1a Mat-a <i>ura3-1 ade2-1 leu2-3,112his3-11 trp1-2 can1-100 sml1Δ mec1Δ::URA3 smc2-3xHA (LEU2)</i>

Taula 3. Soques de *S. cerevisiae* utilitzades en l'estudi.

1.4 Obtenció de les soques

1.4.1 Obtenció de soques per deleció

S'utilitzaren dues soques de *S. cerevisiae*, una d'elles amb el *checkpoint* intacte i l'altra amb la mutació *mec1Δ*, és a dir, deficient en el mecanisme de vigilància de la fase S per la deleció del transductor central de la via.

La soca silvestre, va ser cedida pel Dr. J. A. Tercero (Tercero and Diffley, 2001). A partir d'aquesta es generà la soca *mec1Δ* tal i com es descriu a continuació. La soca progenitora és mutant pel gen *ura3-1*, per tant necessita uracil addicionat al medi de cultiu per poder créixer ja que és incapaç de sintetitzar-lo. Per tant, l'estratègia va consistir a substituir el gen *MEC1* pel gen *URA3*, que, a més, ens va permetre seleccionar els clons positius.

Es van dissenyar oligonucleòtids específics per tal de deleccionar *MEC1* completament:

MEC1F:

5'-TGACGAATTGATATTGGCAATAAAAGACCTGAACTCGG
GGGTGGATTCAA_gcggtattttctccttacgc-3'

MEC1R:

5'-ATACATCTTGCTTAGATTGTCTTCTGATGTTGCTTCTTGGAT
CAATGT_ttagattgtactgagagtgcac-3'

Aquests oligonucleòtids presentaven a l'extrem 5' una seqüència de 50 bases complementària a una regió de la seqüència del locus de *MEC1* (indicades en majúscules), seguida d'una seqüència de 20 bases complementària a un cassette que conté el gen del marcador auxotròfic *URA3* sota el control del seu propi promotor (indicades en minúscules). Es va fer una PCR utilitzant com a DNA motlle 20 ng del plasmidi pRS306 (*URA3*) (Sikorski and Hieter, 1989) sota les següents condicions: 200 µM de cada dNTPs; 0,5 µM de cada oligonucleòtid i 0,1 unitats de *TripleMaster Polymerase* (Eppendorf), en un volum final de 50 µl en tampó subministrat pel fabricant.

La reacció es va fer :

- Desnaturalització inicial 2 minuts a 94 °C
- 30 cicles:
 - desnaturalització 94 °C, 55 segons
 - anellament 55 °C, 30 segons
 - extensió 72 °C, 70 segons
- extensió final 8 minuts a 72 °C

El producte de PCR va ser comprovat electroforèticament en gel d'agarosa. El producte es va purificar amb el kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen). El DNA eluït s'utilitzà per transformar la soca salvatge pel mecanisme de vigilància de la integritat genòmica. La reparació per recombinació homòloga afavoreix la integració d'*URA3* al locus de *MEC1*, tal i com s'indica a la figura 10.

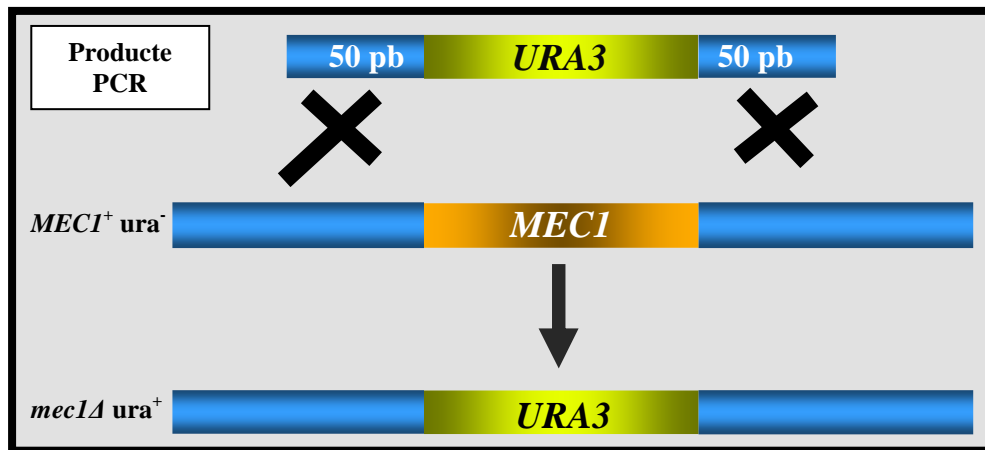


Figura 10. Substitució del gen *MEC1* per *URA3* a través de recombinació homòloga.

La substitució del locus *MEC1* pel marcador *URA3*, ens va permetre seleccionar els llevats transformants ja que eren capaços de créixer en medi sense uracil, mentre que les cèl·lules de la soca parental són auxotròfiques per aquest marcador.

1.4.2 Obtenció de soques que expressen una proteïna etiquetada

Com no existeixen anticossos comercials contra Smc2p de *S. cerevisiae* es van generar soques que expressaven Smc2p amb una etiqueta. Es va fer per comprovar Smc2p com a diana del mecanisme de vigilància de la integritat genòmica. Aquestes soques es van construir utilitzant la soca salvatge pel mecanisme de supervivència i la *mec1Δ*, substituint el gen *SMC2* endogen per un *SMC2* amb tres etiquetes d'hemaglutinina en tàndem (3xHA) intersticial.

Per fer-ho es partí de la construcció cedida pel Dr. A. V. Strunnikov (Strunnikov et al., 1995), en la qual s'havia clonat *SMC2* sota el control del seu propi promotor en un plasmidi pRS425 (*LEU2*). Dins de la diana SpeI del locus de *SMC2* s'havia introduït la seqüència de 3xHA.

Es va retallar el fragment corresponent al locus *SMC2*-3xHA juntament amb el marcador *LEU2* digerint 2 µg de la construcció amb les endonucleases XbaI i SalI (New England Biolabs), com es mostra en la figura 11. S'incubà 60 minuts a 37 °C. Seguidament es va comprovar en un gel d'agarosa i es retallà la banda corresponent a 6 Kb amb el kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen). Aquest fragment fou utilitzat per transformar les soques adients de *S. cerevisiae*.

La incorporació del marcador *LEU2* juntament amb *SMC2* etiquetada, ens va permetre discriminar els llevats transformants de la resta, ja que aquests són capaços créixer en medi sense leucina. La soca parental és auxotròfica per aquest marcador.

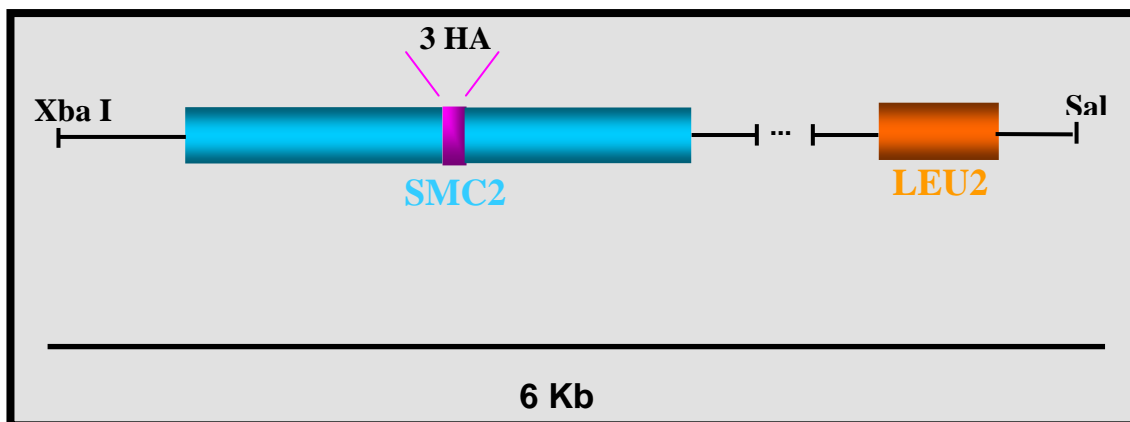


Figura11. Fragment de 6 Kb amb *SMC2*-3HA que serví per substituir el *SMC2* endogen.

1.5 Transformació de soques de llevat

Per deletar el gen *MEC1* a través de la integració del cassette *URA3*, es van transformar cèl·lules *sm11Δ* amb el producte de PCR descrit al punt de Materials i Mètodes 1.4.1. També s'utilitzà per substituir el locus endogen de *SMC2* per la construcció *SMC2*-3xHA i *LEU2* (veure Materials i Mètodes 1.4.2) de les soques salvatge i defectiva pel *checkpoint*.

Es van créixer els cultius de les corresponents soques de llevat en medi ric YPD líquid (veure Materials i Mètodes 1.2) durant la nit. Al matí següent es comprovà la densitat dels cultius mitjançant recompte en una cambra de Neubauer i es diluïren a $4 \cdot 10^6$ cèl·lules/ml, en un volum final de 20 ml de YPD. Els cultius es deixaren creixent a 30 °C amb agitació, fins assolir una densitat de $1 \cdot 10^7$ cèl·lules/ml. D'aquesta forma ens assegurarem, que els llevats dels cultius estaven en fase de creixement exponencial, factor que optimitza la competència de transformació.

Un cop assolida la densitat desitjada s'agafaren 10 ml del cultiu i es centrifugaren 4 minuts a 1000 g. Es rentaren amb aigua desionitzada estèril. Els pellets de cèl·lules es resuspengueren en 1 ml de 0,1 M d'acetat de liti/TE (10 mM Tris·HCl pH 7,5; 1mM EDTA) estèril i es tornaren a centrifugar en les mateixes condicions. L'acetat de liti serveix per afeblir la paret cel·lular dels llevats. El següent pas consistí en resuspendre els pellets novament amb acetat de liti/TE a una densitat de $2 \cdot 10^9$ cèl·lules/ml.

Seguidament es barrejaren 1×10^8 cèl·lules, 50 μg de ssDNA i 1 μg del producte a transformar. El ssDNA (d'esperma de salmó prèviament desnaturalitzat a 95 °C) fa de vehicle del DNA de doble cadena amb el que es vol transformar les cèl·lules, augmentant el rendiment de la transformació. A la barreja se li afegiren 300 μl d'una solució que contenia 1 volum d'una solució mare de 100 mM Acetat de liti pH 7,5; 40% (v/v) polietilenglicol 4000 (PEG); 10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA. El PEG és un polímer inert que segresta l'espai lliure facilitant la trobada del DNA amb les cèl·lules. Aquesta barreja s'incubà a 30 °C durant 30 minuts.

A continuació s'afegí DMSO fins al 10% (v/v). Aquest dissolvent orgànic permeabilitza la paret augmentant dràsticament l'eficiència de la transformació. I es procedí a la transformació dels cultius de llevat per xoc tèrmic a 42 °C durant 15 minuts.

Les cèl·lules es van refredar en gel i a continuació es van recuperar per centrifugació a 1000 g. El medi de transformació es va eliminar i els pellets es resuspengueren en TE estèril per tal de sembrar les cèl·lules en plaques de medi SD.

Les plaques s'incubaren a 30 °C durant 4 dies fins que es desenvoluparen colònies transformants.

En el cas de la deleció de *MEC1*, els clons transformants que integraren el cassette *URA3* foren seleccionats en medi SD sense uracil (veure Materials i Mètodes 1.2).

En el cas de la substitució del locus endogen de *SMC2*, els clons transformants van ser seleccionats en medi SD sense leucina (vegeu 1.2).

1.6 Comprovació de les soques

1.6.1 Comprovació de la soca *mec1Δ* per PCR genòmica

- Extracció de DNA genòmic

S'inoculà en 20 ml de YPD una colònia individual de les soques *MEC1+* i *mec1Δ*. Els cultius s'incubaren tota la nit a 30 °C amb agitació a 2000 RPM.

Al matí següent s'agafaren 4 ml de cada cultiu i es centrifugaren a 1000 g per eliminar el sobrenedant. S'afegiren 500 μl de solució de lisi (100 mM Tris·HCl pH 8; 100 mM NaCl; 1

MATERIAL I MÈTODES

mM EDTA; 0,1% (p/v) SDS) i 500 µl de boles de vidre amb un diàmetre de 450 µM per trencar la paret cel·lular de forma mecànica amb sèries de vòrtex de 90 segons. Per extreure el DNA s'afegiren 500 µl d'una solució de fenol/cloroform/isoamil alcohol (25:24:1) i novament es vortexaren les mostres.

Seguidament es centrifugaren a 16000 g durant 3 minuts a 4 °C. Es recuperà la fase aquosa que conté els àcids nuclèics. Al volum recollit se li afegí un altre volum d'isopropanol i la barreja es deixà 15 minuts en glaç perquè el DNA precipités.

Les mostres es centrifugaren a 16000 g durant 20 minuts a 4 °C i s'eliminà el sobrenedant completament. El pellet de DNA es rentà amb etanol 70% (v/v). Es va fer una nova centrifugació amb les mateixes condicions anteriors i s'eliminà completament l'etanol. Finalment el DNA es va redissoldre en 50 µl de TE (10 mM Tris·HCl pH 8; 1mM EDTA), complementat amb 10 µg/ml de RNasa A per eliminar les restes de RNA co-purificat. La barreja s'incubà 3 hores a 37 °C.

- PCR

S'utilitzaren oligonucleòtids encebadors per a la regió llandant a la zona substituïda:

MEC1chkF: 5'-CTACGAGGCCGAGCTGAGGG-3'
MEC1chkR: 5'-ATGCACTGCCACCGTAGGTC-3'

Condicions de la PCR: 50 ng de DNA genòmic, 200 µM de cada dNTPs, 0,5 µM de cada oligonucleòtid i 1 unitat de Taq Polymerase (New England Biolabs), en un volum final de 50 µl en tampó subministrat pel fabricant.

La reacció es va fer :

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">• desnaturalització inicial 2 minuts 94 °C• 30 cicles:<ul style="list-style-type: none">○ desnaturalització 92 °C, 10 segons○ anellament 55 °C, 30 segons○ extensió 72 °C, 67 segons• extensió final 10 minuts a 72 °C |
|--|

El producte de PCR es va comprovar per electroforesi en gel d'agarosa (vegeu Materials i Mètodes 3.4).

1.6.2 Prova funcional de la soca *mec1Δ*

Es comprovà funcionalment la deleció de *MEC1*, a partir d'un clon individual de les soques *MEC1+* i *mec1Δ* sembrant els clons en medi ric (YPD) sòlid complementat amb 0,2 M hidroxiurea (HU) i en plaques de medi ric, on creixeran totes dues soques (Tercero and Diffley, 2001).

Les plaques s'incubaren a 30 °C durant 6 dies.

1.6.3 Comprovació de les soques *SMC2-3HA* per Western blot

S'inocularen colònies individuals de les soques *MEC1+ SMC2-3HA* i *mec1Δ SMC2-3xHA* en 20 ml de YPD i s'incubaren a 24 °C i 200 RPM durant tota la nit.

Al matí es van realitzar les extraccions de proteïnes adients (veure Materials i Mètodes 1.11) i es va fer un western blot anti-HA (veure Materials i Mètodes 1.14) per confirmar la presència del Smc2p recombinant.

1.7 Índex de gemmació (IG)

Aquest paràmetre serveix per estimar *in situ* el grau de sincronització dels cultius de llevat i la corresponent fase cel·lular en que es troben.

El llevat de gemmació té la particularitat que durant el cicle cel·lular varia característicament la seva morfologia, segons l'absència/presència i mida de la gemma (figura 9). Així, quan les cèl·lules són a fase G1 presenten una morfologia arrodonida i sense gemma. Els cultius es van considerar ben sincronitzats en G1 quan l'IG era inferior al 10%.

$$IG = \frac{\text{Núm. cèl·lules gemmades}}{\text{Núm. total cèl·lules}} \times 100$$

Fórmula per calcular l'índex de gemmació

Per altra banda, quan les cèl·lules entren en fase S desenvolupen petites gemmes que van creixent a mesura que el llevat progressa en el cicle cel·lular, fins que es produeix la citocinesi. Es van considerar cultius ben alliberats del bloqueig quan presentaven un IG superior al 50% després d'una hora d'alliberament del bloqueig en G1.

1.8 Sincronització de cultius en fase G1

Es prepararen cultius de les soques *MEC1+* i *mec1Δ*, així com de les *MEC1+ SMC2-3HA* i *mec1Δ SMC2-3HA* i s'incubaren a 24 °C i 200 RPM d'agitació tota la nit.

Al matí següent els cultius es diluïren a una concentració de 5×10^6 cels/ml i s'incubaren a 24 °C, 200 RPM, durant 2 h. Seguidament es va mesurar la densitat cel·lular en una cambra de Neubauer per confirmar que les poblacions cel·lulars s'haguessin doblat, establint així que els cultius es trobaven en fase de creixement exponencial.

S'afegí la feromona factor α (5 mg/ml) per tal d'aturar les cèl·lules a final de la fase G1, ja que les soques utilitzades eren del genotip "a". Els cultius es van incubar 2 h 15 min a 24 °C, 200 RPM, temps d'un cicle cel·lular complet, per tal que totes les cèl·lules arribessin i s'aturessin al final de la fase G1.

Es va comprovar la sincronització mesurant l'índex de gemmació (vegeu Materials i Mètodes punt 1.7). S'establí com a límit inferior el 10% de cèl·lules gemmades. D'aquesta manera varem confirmar que el 90% de les cèl·lules dels nostres cultius eren a fase G1 (no gemmades).

1.9 Activació del *checkpoint* de fase S en *S. cerevisiae*

Un cop els cultius foren sincronitzats es procedí a alliberar-los sincrònicament a fase S en condicions activadores del *checkpoint*.

Per generar les condicions d'estrès replicatiu en aquest treball s'utilitzà la hidroxiiurea (HU), que inhibeix el centre actiu de les ribonucleotidilreductases (RNR). Aquestes proteïnes catalitzen el pas de nucleòtids difosfat (NDP) a desoxinucleòtids difosfat (dNDP). D'aquesta manera en presència d'HU les cèl·lules no poden sintetitzar dNDPs de novo i, en conseqüència, tampoc desoxinucleòtids trifosfat (dNTP). Per aquest motiu poc després de començar la replicació les reserves de dNTPs s'exhaureixen i les forquilles de replicació s'aturen, la qual cosa porta a l'activació del *checkpoint* de fase S. La soca *mec1Δ* tot i no ser capaç d'activar el *checkpoint* no podrà progressar al llarg de la fase S per no poder sintetitzar els precursors de la replicació.

Les cèl·lules sincròniques foren pelletejades i sotmeses a dos rentats amb 25 ml de YPD per eliminar la feromona factor α (centrifugacions de 2 minuts a 1000 g a temperatura ambient).

Les cèl·lules es resuspengueren en YPD suplementat amb 0,2 M d'HU. Els cultius s'incubaren a 24 °C, 200 RPM durant 1 h.

1.10 Citometria de flux activada per fluorescència

Aquesta tècnica, també anomenada FACS, permet mesurar la quantitat de DNA de les cèl·lules d'un cultiu marcant-lo amb iodur de propidi, un agent intercalant del DNA fluorescent. D'aquesta forma, permet estimar la distribució de les cèl·lules d'un cultiu en les diferents fases del cicle cel·lular.

Varem utilitzar el FACS per confirmar la sincronització de les soques amb la feromona factor α al final de la fase G1, així com per confirmar l'efecte de la HU bloquejant la progressió en fase S.

Les cèl·lules es processaren de la següent manera: s'agafaren aproximadament 5×10^6 cèl·lules dels cultius corresponents (asincrònics, dels cultius sincronitzats en G1 i dels cultius alliberats). El medi de cultiu s'eliminà per centrifugació. Les cèl·lules es fixaren en 1 ml d'etanol 70% a 4 °C durant un mínim de 12 h.

Seguidament s'eliminà l'etanol per centrifugació i les cèl·lules foren rehidratades mitjançant dos rentats amb 50 mM Tris pH 7,8. Per eliminar la contribució del RNA, els botons cel·lulars es van resuspendre en 1 ml de 50 mM Tris pH 7,8 en presència de 200 µg/ml RNasa A. S'incubaren 2 h a 37°C.

S'eliminà aquesta solució per centrifugació i es procedí a permeabilitzar la paret cel·lular per digestió limitada per pepsina. Les cèl·lules es van resuspendre en 0,5 ml de HCl 50 mN contenint 5 mg/ml de pepsina i s'incubaren a 37 °C durant 30 minuts.

Transcorregut aquest temps les mostres es van centrifugar i es rentaren amb solució de FACS (200 mM Tris-HCl pH 7,5; 211 mM NaCl i 78 mM MgCl₂) per inactivar les restes de pepsina.

El següent pas consistí en tenyir el DNA de les cèl·lules amb iodur de propidi. Els botons es van resuspendre novament en 0,5 ml de solució de FACS amb 55 µg/ml de iodur de propidi.

Abans de la lectura es transferiren 50 µl de cada suspensió cel·lular a un tub de FACS que contenia 1 ml de 50 mM Tris pH 7,8 i es sonicaren breument (50 W, 8 segons) per eliminar la formació d'agregats.

Les lectures es van portar a terme en un citòmetre FACScalibur (Becton-Dickinson). Les cèl·lules passen per un microcapil·lar que permet el seu comptatge i lectura fluorescent individualitzada. Cada partícula emet una intensitat de llum proporcional al seu contingut de DNA. Es van obtenir perfils poblacionals pel comptatge d'un total de 20000 esdeveniments en cada mostra.

1.11 Extracció de proteïnes

Segons la finalitat perquè foren extretes les proteïnes, s'utilitzaren diferents protocols:

- Extracció de proteïnes amb àcid tricloroacètic (TCA) per western blot

Aquest sistema d'extracció de proteïna fou utilitzat per la comprovació de l'activació del *checkpoint* de fase S en la soca *MEC1+* i la no activació en la soca mutant *mec1Δ*. També s'utilitzà en la comprovació de Smc2p-3xHA i Scp160p com a dianes del mecanisme de manteniment de la integritat genòmica.

L'àcid tricloroacètic (TCA) serveix per obtenir extractes cel·lulars totals. Garanteix la immediata i completa desnaturalització de proteases, quinases i fosfatases que podrien alterar la composició dels els extractes.

Es van agafar mostres dels cultius equivalents a 10^8 cèl·lules, es centrifugaren per eliminar el medi de cultiu, i es rentaren dos cops amb aigua desionitzada freda. Els pellets cel·lulars es van resuspendre amb 200 µl de TCA 20% (v/v) i s'afegiren 200 µl de boles de vidre amb un diàmetre de 0,45 mm per procedir al trencament mecànic de la paret cel·lular de *S. cerevisiae*. Les mostres van ser vortexades durant 1 minut. Els lisats foren recollits. Per precipitar les proteïnes desnaturalitzades els extractes es centrifugarem 10 minuts a 900 g a temperatura ambient. El pellet proteic es va dissoldre en 200 µl de tampó d'aplicació de mostres per a electroforesi de proteïnes (50mM Tris-HCl pH 6,8; 8% (v/v) glicerol; 4% (v/v) 2-mercaptoetanol; 1,6% (v/v) SDS; 0,008% (p/v) blau de bromofenol). El TCA es neutralitzà afegint 40 µl de Tris 1 M per evitar la proteòlisi àcida de les proteïnes. Les mostres es van bullir 4 minuts.

- Extracció de proteïnes per a 2D-DIGE

Per als experiments de 2D-DIGE es va utilitzar un medi de lisi d'urea per assegurar la immediata i completa desnaturalització de proteases, quinases i fosfatases. En aquest cas no es va utilitzar el TCA descrit a l'apartat anterior ja que l'acidificació de la mostra alteraria la primera dimensió del 2D-DIGE, on les proteïnes es separen pel seu punt isoelèctric.

Els cultius líquids es van centrifugar a 900 g durant 1 minut a 4°C i es feren dos rentats amb aigua desionitzada freda.

A la cambra freda, els pellets es van resuspendre amb 1 ml de tampó de lisi fred (8 M Urea; 0,5% (p/v) CHAPS i 1 mM DTT) i el contingut es transferí a tubs Corex de 10 ml. S'afegí 1 ml de boles de vidre de diàmetre 0,45 mm i es procedí al trencament mecànic de la paret dels llevats mitjançant 6 rondes de 30 segons de vòrtex, intercalant amb 1 minut de repòs sobre glaç (per evitar escalfament). Els lisats es deixaren extreure durant 30 minuts a 4°C. Seguidament es va procedir a la clarificació dels extractes centrifugant les mostres a 15000 g durant 30 minuts a 4 °C. Es recolliren els sobrenedants.

- Extracció de proteïnes per immunoprecipitació

Per estudiar la fosforilació de Smc2p dependent del *checkpoint* de fase S es va immunoprecipitar la proteïna. Es va realitzar una extracció amb tampó de lisi no desnaturalitzant. La immunoprecipitació es va fer en el mateix tampó d'extracció, si aquest hagués estat desnaturalitzant hauria trencat l'estructura terciària de l'anticòs i no hauria reconegut el seu epítip.

Es van resuspendre els pellets de 10^8 cèl·lules de les corresponents soques en 2 ml de tampó de lisi fred (50 mM Tris pH 7,7; 500 mM NaCl; 10% (v/v) glicerol; 1 mM EDTA; 0,1% (v/v) NP-40; 1 mM NaF; 0,5 mM Na_3VO_4 ; 1 μM leupeptina; 0,15 μM aprotinina; 1 μM pepstatina; 1 mM PeFaBloc).

S'afegí 1 ml de boles de vidre de 0,45 mm de diàmetre per procedir al trencament mecànic de la paret cel·lular del llevat mitjançant 6 rondes de 30 segons de vòrtex a la cambra freda. Els lisats es van extreure durant 1 hora en gel, en aquest cas s'utilitzaren condicions de força iònica molt elevades, 500 mM NaCl, per assegurar-nos d'extreure tota la proteïna Smc2 de les cèl·lules, per altra banda no ens interessaven les possibles interaccions de Smc2 amb altres proteïnes.

L'últim pas fou una clarificació centrifugant les mostres 15 minuts a 15000 g a 4 °C. Es recolliren els sobrenedants i es conservaren a -80 °C.

1.12 Quantificació de la concentració de proteïna per 2D-DIGE

Els extractes proteics per a 2D-DIGE obtinguts segons es descriu a l'apartat anterior es van quantificar amb el *Bio-Rad DC protein assay* (BioRad). Aquest mètode és una modificació del mètode *Lowry* que permet la quantificació fiable de proteïna en tampons que contenen detergents. Com a estàndard s'utilitzà albúmina de sèrum boví (0,2; 0,4; 0,7; 0,9 mg/ml).

Les mostres i estàndards es van llegir en un espectrofotòmetre a una longitud d'ona de 750 nm.

1.13 Immunoprecipitació de proteïna

Per estudiar la possible fosforilació de Smc2p pel *checkpoint* s'immunoprecipità la proteïna recombinant unida a l'etiqueta HA. Es descongelaren els extractes proteics i s'afegiren 100 ng d'anticòs anti-HA 3F10 (Hibridoma) per reacció i s'incubà 90 minuts a 4 °C en agitació orbital.

El següent pas fou afegir 30 µl de boles de proteïna G sefarosa, *GammaBind G sepharose beads* (Amersham), en una proporció del 20% (p/v). Les boles es van equilibrar prèviament amb el tampó de lisi utilitzat en l'extracció proteica (vegeu Materials i Mètodes 1.11). La proteïna G uneix específicament la regió constant de la cadena pesada dels anticossos (Fc). Les reaccions s'incubaren en rotació orbital durant 1 hora a la cambra freda.

L'últim pas fou la separació de complex antigen/ anticòs/ proteïna G sefarosa de la resta de l'extracte proteic; els complexos formats es rentaren 4 vegades amb tampó de lisi per eliminar les unions inespecífiques de la sefarosa i finalment es van pelletejar a través d'una centrifugació d'un minut a 1000 g i 4 °C.

Els immunoprecipitats es bulliren en 40 µl de tampó d'aplicació de mostres per a electroforesi de proteïnes (50 mM Tris-HCl pH 6,8; 8% (v/v) glicerol; 4% (v/v) 2-mercaptoetanol; 1,6% (p/v) SDS; 0,008% (p/v) blau de bromofenol) durant 4 minuts. D'aquesta manera es separaren els complexos formats durant la immunoprecipitació i es desnaturalitzaren les proteïnes. Es va fer un WB (vegeu 1.12) amb l'anticòs anti-serina/tirosina/treonina fosforilades (Abcam) per avaluar l'estat de fosforilació global.

1.14 Western Blot

S'utilitzà per mesurar l'estat de fosforilació de la proteïna Rad53p que indica l'activitat del mecanisme de vigilància de la integritat genòmica (Tercero and Diffley, 2001), així com per estudiar les proteïnes Smc2p-3xHA i Scp160p com a dines del *checkpoint* de fase S.

Un volum corresponent 2×10^6 cèl·lules dels extractes proteics en TCA (vegeu Material i Mètodes 1.12) es carregaren en gels desnaturalitzants d'acrilamida 7,5% (v/v) (BioRad) amb una relació acrilamida/bisacrilamida de 37,5:1. Els gels es van córrer a 180 V durant 2 h en tampó de carrera (25 mM Tris-glicina pH 8,3; 0,1 % (p/v) SDS).

Seguidament es va fer l'electrotransferència de les proteïnes utilitzant un sistema semisec (Owl Separation System) amb tampó *Towbin* modificat (50 mM Tris-glicina pH 9,1; 0,0373% (p/v) SDS; 20% (v/v) metanol) a membrana de nitrocel·lulosa (0,45 μ m Protran, Schleicher & Schuell), sota un amperatge de 2,5 mA/cm² durant una hora.

Les membranes es van tenyir transitòriament amb Ponceau S (0,2% (p/v) i 3% (v/v) àcid acètic glacial) per tal de comprovar la correcta transferència de les proteïnes, així com la càrrega equitativa dels carrils.

Anticòs 1ari	Dilució	Anticòs 2ari	Dilució
Rad53 (Santocanale and Diffley, 1998)	1:1000	Proteïna A-HRP (DAKO)	1:10000
Anti-HA (3F10) (Hibridoma)	1:2000	Anti-rata-HRP (DAKO)	1:1000
Scp160 (Marsellach et al., 2006)	1:1000	Anti-conill-HRP (DAKO)	1:3000
Anti-Ser/Thr/Tyr fosforilades (Abcam)	1:200	Anti-ratolí-HRP (DAKO)	1:3000
CHK1 fosforilat (Ser354) (133D3) (Cell Signaling)	1:2000	Anti-conill-HRP (DAKO)	1:3000
CHK1 total (G-4) (Santa Cruz)	1:2000	Anti-ratolí-HRP (DAKO)	1:3000
β -actina (AB1) (Calbiochem)	1:5000	Anti-ratolí-HRP (DAKO)	1:3000
Ciclina E2 (EP454Y) (Abcam)	1:3000	Anti-conill-HRP (DAKO)	1:3000

Taula 4. Sumari dels anticossos utilitzats per WB. En groc es mostren els anticossos emprats per reconèixer proteïnes de llevat i en lila els utilitzats en extractes humans.

Les membranes de nitrocel·lulosa foren bloquejades amb 5% (p/v) llet descremada en pols en TBS-Tween (100 mM Tris-HCl pH7,4; 150mM NaCl; 0,1% (v/v) Tween-20) durant 20 minuts. Després la membrana es va incubar amb l'anticòs i la seva dilució corresponent en solució de bloqueig (taula 4). Després d'1 hora d'incubació, l'excés d'anticòs fou eliminat a partir de tres rentats amb TBS-T durant 5 minuts cadascun. Les membranes es van incubar 30 minuts amb l'anticòs secundari corresponent diluït en TBS-T (taula 4). Novament l'excés de secundari s'eliminà amb 3 rentats de 5 minuts amb TBS-T.

Finalment les membranes s'incubaren 1 minut amb el *Supersignal West Pico Chemiluminiscent* (Pierce) i s'exposaren en paper d'autoradiografia.

1.15 Anàlisi 2D-DIGE (*Bidimensional Differential In-Gel Electrophoresis*)

El 2D-DIGE és una tècnica proteòmica que es basa en la comparació de dos proteomes diferents en un únic gel bidimensional. És una variació dels assaigs de separació de proteomes en gels 2D. Aquesta tècnica fou desenvolupada per Ünlü i col·laboradors (Ünlü et al., 1997) i a l'actualitat és distribuïda per Amersham Bioscience.

Els dos extractes proteics que es volen comparar es marquen amb fluorocroms diferencials. Per les mostres a comparar s'utilitzen els fluorocroms propil-Cy3 (cianina 3) (fluorescència verda) i metil-Cy5 (cianina 5) (fluorescència vermella). Aquests grups s'uneixen covalentment als grups amino ϵ de les lisines per formar un grup amida. Un cop marcats, els extractes a comparar es barregen posant la mateixa quantitat de proteïna total de les mostres. Juntament amb les mostres a comparar es corre un estàndard intern que es preparat barrejant la mateixa quantitat de proteïna de cada mostra i es marcat amb una tercera sonda Cy2 (cianina 2) (fluorescència blava). L'estàndard intern serveix com a control de càrrega per estandaritzar en cada punt les fluorescències de cadascuna de les mostres a comparar, d'aquesta manera la tècnica ens permetrà quantificar diferències entre proteomes.

Aquesta tècnica presenta avantatges respecte el 2D tradicional:

- Permet detectar canvis d'inducció, destrucció, acumulació i modificacions post-traduccionals en proteïnes entre dues mostres.
- En carregar les mostres a comparar en un únic gel bidimensional es redueix la variabilitat que es produeix analitzant dos gels independents, facilitant la comparació de cada punt (Zhou et al., 2002).

- L'estàndard intern fa que la tècnica sigui quantitativa.

1.15.1 Disseny experimental

Tots els experiments de sincronització i activació del mecanisme de vigilància de la integritat genòmica es varen fer per quadruplicat, havent realitzat cada parella experimental en dies independents:

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Soca salvatge (A1) vs soca <i>mec1Δ</i> (B1) • Soca salvatge (A2) vs soca <i>mec1Δ</i> (B2) • Soca salvatge (A3) vs soca <i>mec1Δ</i> (B3) • Soca salvatge (A4) vs soca <i>mec1Δ</i> (B4) |
|--|

Cadascuna de les parelles es va carregar en un gel bidimensional seguint les següents combinacions de fluorocroms:

	Cy3	Cy5	Cy2
Gel			
1	A1	B1	STD Pool A1-4, B1-4
2	A2	B2	STD Pool A1-4, B1-4
3	B3	A3	STD Pool A1-4, B1-4
4	B4	A4	STD Pool A1-4, B1-4

Com es pot veure el disseny de l'experiment es va fer de manera que en dues parelles la mostra A es marcà amb el fluorocrom Cy3 i la corresponent mostra B amb el Cy5, mentre que amb les altres dues parelles es feu al revés per evitar possibles desviacions degudes al marcatge preferencial per un dels fluorocroms.

Com a estàndard intern s'utilitzà un pool format per quantitats idèntiques de cadascuna de les vuit mostres marcat amb Cy2.

En cada gel es van carregar 50 µg de la mostra A, 50 µg de la mostra B i 50 µg de l'estàndard intern. La metodologia del 2D-DIGE es resumeix a la figura 12.

1.15.2 Neteja de les mostres

Per eliminar possibles contaminants que poguessin interferir en la reacció de marcatge amb les sondes Cy, les proteïnes preparades com es descriu en Materials i Mètodes 1.11 es van sotmetre a una precipitació en TCA/acetona (2D Clean-Up

Kit, Amersham). Els pellets proteics obtinguts es redissolgueren en el mateix tampó de lisi (vegeu 1.11)

Seguidament es va quantificar la concentració proteica obtinguda pel mètode de Lowry (RC/DC Kit, BioRad) per tal de prendre exactament 50 µg de proteïna de cada mostra.

1.15.3 Marcatge de les proteïnes

El grup reactiu èster hidroxisuccinimidil de les sondes Cy, reacciona amb els grups amino de les cadenes laterals de les lisines presents a les proteïnes. S'utilitzaren aplicant el criteri de marcatge de sonda mínima, de manera que es marca només el 1% de la proteïna total. Això es fa per 3 motius (i) evitar la saturació de la senyal fluorescent, (ii) perquè desvia la posició al gel bidimensional al introduir una càrrega neta positiva i un increment en massa de 0,5 KDa per cada una de les lisines amb les que reacciona i (iii) perquè dificulta la posterior formació de pèptids tríptics (és a dir, els pèptids generats per la lisi de les proteïnes a través de tripsina). La proporció utilitzada fou 400 pmol sonda Cy3 o Cy5 per 50 µg de proteïna. Aquesta reacció es porta a terme sobre gel, durant 30 minuts i protegida de la llum per evitar l'extinció dels fluorocroms. A continuació s'afegí lisina a una concentració final de 0,5 mM per neutralitzar l'excés de les sondes Cy.

Paral·lelament es va preparar un estàndard intern barrejant 25 µg de proteïna de cadascuna de les quatre parelles experimentals i es marcà de la mateixa manera descrita prèviament, en aquest cas amb sonda Cy2.

1.15.4 Electroforesi primera dimensió

Es van preparar les mostres per cadascun dels gels DIGE barrejant 50 µg de proteïna de la mostra A, 50 µg de proteïna de la mostra B i 50 µg de proteïna de l'estàndard intern. A cada barreja se li afegí un volum igual de solució de carrera (7 M urea, 2 M tiourea, 4% (p/v) CHAPS, 2% (p/v) DTT, 2% (p/v) anfòlits pH 3-10 NL (Amersham) i 0,002% (p/v) de blau de bromofenol).

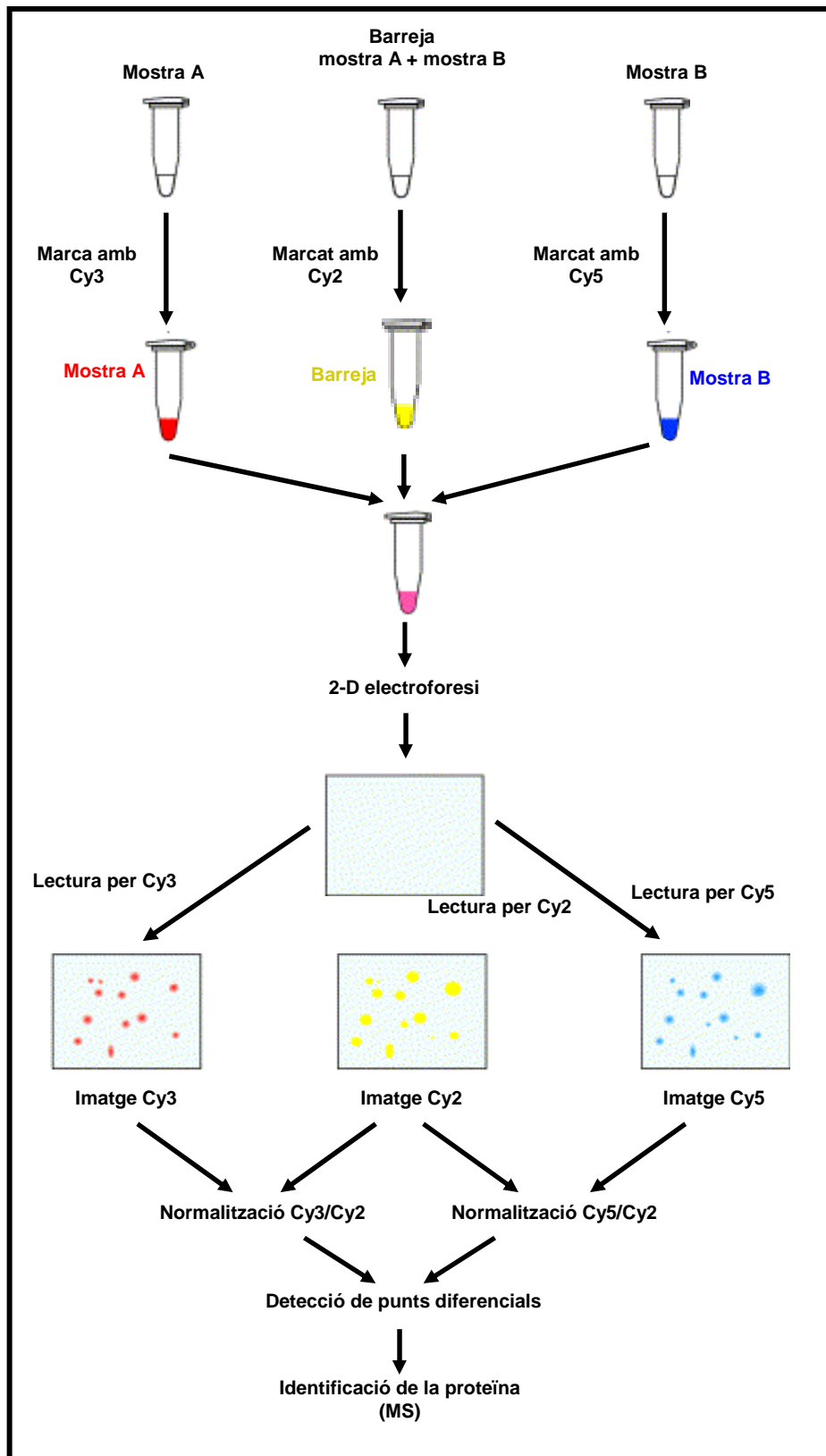


Figura 12. Procés utilitzat en el 2D-DIGE. Modificat de www.bioscience.ucla.edu

Per a la separació per enfocament isoelèctric, s'utilitzaren tires d'acrilamida amb gradient de pH immobilitzat (Immobiline DryStrips, Amersham) de 24 cm, pH 3-10 NL. La càrrega de les mostres es realitzà pel mètode de *Cup Loading*, en tires prèviament rehidratades amb 450 µl de 7 M urea, 2 M tiourea, 4% (p/v) CHAPS, 97 mM reactiu DeStreak (Amersham), 1% (p/v) anfòlits pH 3-10 NL (Amersham) i 0,002% (p/v) de blau de bromofenol, durant 22 hores a temperatura ambient.

L'enfocament isoelèctric es va dur a terme amb l'equip IPGphor (Amersham) amb el programa:

Pas 1: Step-n-hold, 300 V, 3 h
Pas 2: Gradient, 1000 V, 6 h
Pas 3: Gradient, 8000 V, 3 h
Pas 4: Step-n-hold, 8000 V, 4:40 h

1.15.5 Electroforesi segona dimensió

Les proteïnes es resolgueren en una segona dimensió segons la massa molecular, acoblant les tires de la primera dimensió a gels SDS-PAGE de 26 x 22 cm, 12,5% (p/v) d'acrilamida, polimeritzats en vidres de baixa fluorescència. S'utilitzà una unitat *Ettan DALT Six* (Amersham). L'electroforesi es va córrer a 3 W/gel durant 30 minuts i a continuació a 17 W/gel fins a la finalització del recorregut.

1.15.6 Adquisició i anàlisi d'imatges

L'adquisició de les imatges de fluorescència per cada una de les tres sondes Cy es realitzà escanejant els gels en un *scanner Typhoon 9400* (GE Healthcare) amb una resolució de 100 µm. S'utilitzaren les següents condicions:

Sonda	Filtre d'emissió (nm)	Làser d'excitació (nm)
Cy2	520	Blau (488)
Cy3	580	Verd (532)
Cy5	670	Vermell (633)

Per l'anàlisi estadística de les imatges de fluorescència generades en l'experiment 2D-DIGE s'utilitzà el software DeCyder (Amersham). El procés constà de tres etapes:

- Detecció dels punts en els diferents gels.
- Superposició dels punts entre els diferents gels.
- Anàlisi estadístic mitjançant test t d'*student* a través la normalització de les quatre rèpliques alhora.

L'anàlisi es realitzà després de normalitzar els volums de cada punt en els diferents gels, utilitzant com referència el volum del corresponent punt observat en la imatge de l'estàndard intern. Es van escollir com a proteïnes d'interès aquelles que presentaven variacions d'abundància superiors a 1.2 vegades en la mostra salvatge respecte a la soca *mec1Δ*, amb un valor de $p < 0,2$ en (test t d'*student*) en les comparacions entre els diferents grups.

1.16 Identificació de proteïnes per espectroscopia de masses (MS)

Es procedí a identificar les proteïnes presents en els punts que presentaven diferències de fluorescència significatives.

Un cop obtingudes les imatges de fluorescència els gels es van tenyir amb nitrat de plata, seguint un protocol compatible amb l'espectrometria de masses (Shevchenko, 2001).

Els punts d'interès es retallaren utilitzant un robot *SpotPicker* (Amersham) i es digeriren amb tripsina (Promega Gold) en el gel (generant els pèptids tríptics), mitjançant un robot digestor *Proteiner DP* (BRUKER). Quan fou necessari els digerits es purificaren a través d'una columna de fase reversa C18 (ZipTip, Millipore) i es concentraren pel seu anàlisi per espectrometria de masses.

La identificació es va realitzar mitjançant la tècnica d'empremta dactilar peptídica, en la qual es fa un anàlisi dels pèptids tríptics per MS/MALDI-TOF (Ultraflex, BRUKER). El mapa peptídic obtingut en cada punt diferencial es comparà en bases de dades amb els mapes peptídics teòrics de les proteïnes, per realitzar-ho s'utilitzà l'algoritme de búsqueda MASCOT (Matrix Science).

La matriu d'ionització emprada pel MS/MALDI-TOF fou l'àcid α -ciano-hidroxicinàmic, i com a suports de mostra AnchorChip (BRUKER).

En els casos en què no es va obtenir una definició clara dels pèptids mitjançant aquesta tècnica, la identificació es va corroborar a través de dades de seqüència a partir d'espectres MS/MS obtinguts per espectrometria ESI-Trampa iònica. L'anàlisi es realitzà per nanoLC-

MS/MS utilitzant un HPLC Ultimate (LC Packings) acoblat a un espectròmetre ESI-Trampa iònica (Esquire HCT, BRUKER).

2. TÈCNiques EN LÍNIes CEL·LULARS HUMANES

2.1 Cultius de línies cel·lulars humanes

Durant el present estudi s'han utilitzat les línies cel·lulars humanes:

- HeLa (ATCC, referència CCL-2): Cèl·lules epitelials humanes de carcinoma cervical.
- HEK293T (ATCC, referència CLR-1573): Cèl·lules embriòniques de ronyó humà immortalitzades amb l'adenovirus 5. Aquestes porten clonat l'antigen T del virus SV40.
- HEK293FT (Invitrogen, referència R700-07): Cèl·lules embriòniques de ronyó humà derivades de la línia HEK293T, són de creixement ràpid.

Les línies cel·lulars es cultivaren en medi DMEM amb alta concentració de glucosa (4,5 g/l), suplementat amb 10% (v/v) de sèrum fetal boví (PAA) i 5% (v/v) d'antibiòtic-antimicòtic (100 unitats/ml penicil·lina G sòdica, 100 unitats/ml d'estreptomicina sulfat) (Gibco).

La línia 293FT es cultivà en medi DMEM amb alta concentració de glucosa amb 10% (v/v) de sèrum fetal boví, 5% (v/v) d'antibiòtic-antimicòtic (100 unitats/ml penicil·lina G sòdica, 100 unitats/ml d'estreptomicina sulfat), 4 mM L-Glutamina (Lonza), 1mM piruvat de sodi (GIBCO), 0,1 mM d'aminoàcids no essencials (Lonza), 500 µg/ml de neomicina (GIBCO).

2.2 Extracció de RNA de cèl·lules HeLa amb TRIzol®

Es varen fer extraccions de RNA per fer microxips d'expressió i PCR a temps real. S'extragué RNA de cèl·lules HeLa no tractades (control negatiu), tractades amb HU (condicions d'estrès replicatiu) i tractades conjuntament amb HU i cafeïna (condicions d'estrès replicatiu i inhibidores del *checkpoint* de fase S). Es va seguir el protocol del reactiu TRIzol® (Invitrogen).

S'afegiren 50 µl de TRIzol® per cada cm² per placa. Les cèl·lules foren rascades de la superfície de cultiu i recollides en tubs, s'incubaren 5 minuts a temperatura ambient. Les mostres es van homogenitzar per lisar correctament les cèl·lules i s'afegiren 0,2 ml de cloroform/ ml de TRIzol® inicial per desproteïnitjar els àcids nuclèics. Seguidament es va fer una centrifugació a 12000 g 4 °C durant 15 minuts per individualitzar els components de

la mostra en tres fases: fase aquosa (àcids nuclèics), interfase semisòlida (proteïnes) i fase orgànica (lípid).

Es recollí la fase aquosa i el RNA es precipità amb 0,5 ml d'isopropanol/ ml de TRIzol[®] utilitzat. El pellet es rentà amb etanol 70% (v/v) i, finalment, els pellets es resuspengueren en 20 µl d'aigua desionitzada lliure de nucleases.

Per tal d'obtenir una major puresa, els RNA utilitzats per realitzar els microxips d'expressió es purificaren adicionalment utilitzant les columnes RNeasy (Qiagen) seguint el protocol *Clean Up* (Qiagen). Els RNA es van resuspendre en 15 µl d'aigua desionitzada lliure de nucleases.

2.3 Microxips

La utilització de microxips d'expressió permet la comparació simultània de l'expressió d'un gran número de gens en unes condicions determinades.

Nosaltres compararem el patró d'expressió induït pel *checkpoint* de fase S en condicions activadores i inhibidores. Per l'estudi s'han utilitzat els microxips d'expressió *Human Genome U133 Plus 2.0* (Affymetrix) en els que trobem representades aproximadament 54000 sondes diferents que engloben 47000 transcrits i isoformes, incloent 38.500 gens humans caracteritzats.

2.3.1 Microelectroforesi en BioAnalyzer 2100

L'ús correcte del microxips d'expressió exigeix que el RNA utilitzat sigui d'alta puresa, per aquest motiu la qualitat i quantitat del RNA extret (Material i Mètodes 2.1.1) es va mesurar en el *BioAnalyzer* 2100 (Agilent). Aquest sistema permet comparar quantitativament la integritat de totes les mostres de l'experiment, ja que per a què els microxips siguin comparables totes les mostres han de tenir una qualitat similar.

El sistema *BioAnalyzer* 2100 consisteix en una microelectroforesi mitjançant l'ús de nanocapil·lars. El software calcula la concentració dels RNA i dos paràmetres numèrics que indiquen la integritat dels mateixos, la relació entre els RNA ribosòmics 28S i 18S i el número RIN (número d'integritat del RNA), que ens indica l'estat de degradació dels RNA de les mostres.

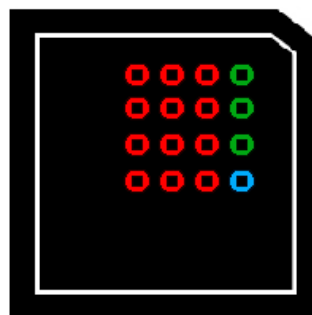
Primer es va preparar el *RNA Nano chip* (Agilent) (figura 13) que és el suport per fer la microelectroforesi. El xip es posà en el *Chip Priming Station* (Agilent) i es carregaren en els pous marcats amb verd una barreja *RNA 6000 Nano Gel Matrix* (Agilent) i *RNA Nano Dye Concentrate* (Agilent) a una proporció 65:1. El primer reactiu és el que formarà el gel per córrer la microelectroforesi i el segon es un fluorocrom que permetrà detectar els RNA de les mostres i els marcadors. El *Chip Priming Station* és un aparell que permet aplicar sobre el xip una pressió constant perquè la barreja de gel i sonda es dispersi pels diferents pous i capil·lars del xip d'una manera equitativa.

El xip es va treure de l'aparell i es carregà el *RNA 6000 Nano Marker* (Agilent) en els pous marcats en vermell i blau. Aquest producte és un marcador de 25 nucleòtids que serveix perquè l'aparell es pugui autocalibrar i situï correctament les bandes de les mostres i del marcador de pes molecular. Per últim es carregaren 250 ng de les mostres en els pous vermells i *RNA 6000 Ladder* (Agilent) en el pou blau. Aquest últim reactiu és el marcador de pes molecular per localitzar les bandes dels RNA ribosomals 18 S i 28 S.

El xip es va agitar en un vòrtex adequat subministrat pel fabricant durant 60 segons i seguidament es va introduir al *BioAnalyzer 2100*.

Es va fer la microelectroforesi i es va analitzar amb el software *Agilent 2100 expert* (Agilent).

Figura 13. Es mostra com es carregà el xip *RNA Nano chip* per fer l'anàlisi quantitativ i qualitativ dels RNA abans de realitzar els microxips d'expressió.



2.3.2 Retrotranscripció de RNA a cDNA

Un cop confirmada la bona quantitat i qualitat del RNA amb el *BioAnalyzer 2100* es procedí a l'obtenció dels DNA còpia (cDNA) que permeteren generar per transcripció *in vitro* les sondes de RNA còpia (cRNA) per hibridar en els microxips d'expressió.

El primer pas fou generar per retrotranscripció la primera cadena de cDNA, per fer-ho s'utilitzà el *One-Cycle cDNA Synthesis kit* (Affymetrix). A 2 µg de RNA total se li afegiren 8 µM

T7-Oligo(dT) (Affymetrix), la barreja s'incubà a 70 °C durant 10 minuts per desnaturalitzar els RNA. Les reaccions es refredaren en gel i s'afegí 10 mM de DTT (agent reductor per estabilitzar la retrotranscriptasa) i 0,5 mM de dNTP en 19 µl de tampó subministrat pel fabricant. Les mostres es preincubaren 2 minuts a 4 °C i s'afegiren 10 unitats de retrotranscriptasa SuperScript II (Invitrogen). La síntesi es realitzà a 42 °C durant 1 hora.

Per realitzar la segona cadena dels cDNA s'utilitzà el mateix kit, *One-Cycle cDNA Synthesis kit* (Affymetrix). A les reaccions de síntesi de la primera cadena de cDNA se'ls afegiren 91 µl d'aigua desionitzada lliure en nucleases, 0,2 mM de dNTP, 0,06 unitats de DNA ligasa d'*E. coli*, 0,03 unitats de DNA polimerasa d'*E. coli* i 0,015 unitats de RNasa H (per degradar el RNA motlle utilitzat en la síntesi de la primera cadena) en 150 µl de tampó subministrat pel fabricant. La reacció s'incubà a 16 °C durant 2 hores.

S'afegiren 0,06 unitats de T4 DNA polimerasa i s'incubà 5 minuts a 16 °C. Aquest enzim addiciona els nucleòtids mancants als l'extrems 3' que ha deixat la polimerasa I, generant extrems roms.

El cDNA es va purificar amb el *DNA Clean Up kit* (Qiagen) seguint el protocol del fabricant per PCR i, finalment, s'eluí en 14 µl d'aigua desionitzada.

2.3.3 Marcatge de les sondes

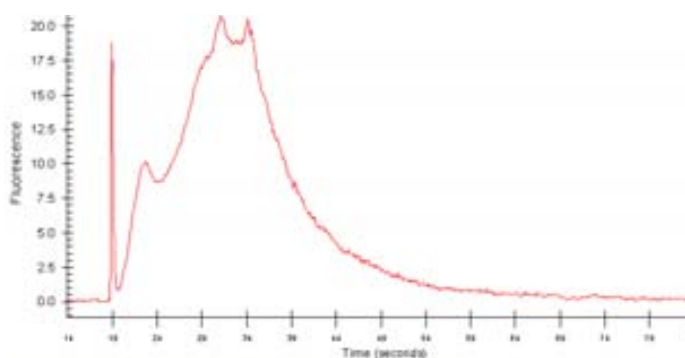
El següent pas, fou generar sondes de RNA marcades, anomenades cRNA, que foren utilitzades posteriorment per hibridar amb els microxips. Es va realitzar una transcripció *in vitro* utilitzant dNTP biotinitats.

Al cDNA total purificat se li afegiren 4 µl de 10X *IVT Labeling Buffer*, 12 µl *IVT Labeling NTP mix*, 4 µl *IVT Labeling Enzim Mix* en un volum final de 40 µl. Les reaccions s'incubaren 16 hores a 37 °C.

Els cRNA biotinitats es purificaren amb columnes *RNA Clean Up* (Qiagen). Els cRNA s'elüïren en 10 µl d'aigua desionitzada lliure de nucleases.

Es realitzà un nou anàlisi amb el *BioAnalyzer 2100* per confirmar la qualitat i quantitat de les mostres. L'electroferograma òptim pel cRNA obtingut a partir del RNA total amb el kit *One-Cycle* s'il·lustra a la figura 14. S'observa la distribució dels ribonucleòtids pel seu pes molecular (determinat pel temps en que els cRNA van passant pel detector). La mitja aritmètica del pes total ha de ser aproximadament de 1580 nucleòtids, corresponent a l'interval de temps de lectura entre 25-40 segons aproximadament.

Figura 14. Electroferograma dels cRNA biotinilats obtinguts a partir del cDNA total generat amb el kit *One-Cycle cDNA synthesis* en cèl·lules HeLa. S'observa la distribució dels ribonucleòtids pel seu pes molecular estimat a partir del temps de detecció dels estàndards (no es mostra). Figura obtinguda del *GeneChip® Expression Analysis Technical Manual* (Affymetrix).



2.3.4 Fragmentació de les sondes

S'ha observat que al fragmentar els cRNA s'obté una millor sensibilitat en els microxips d'expressió. Per aquest motiu i utilitzant els reactius subministrats per Affymetrix es procedí a la fragmentació metàl·lica dels cRNA, així es generaren fragments de 35 a 200 bases. S'utilitzaren 20 µg de cRNA amb el *5X Fragmentation Buffer* en un volum final de 40 µl. Es va incubar 35 minuts a 94 °C.

Es comprovà la fragmentació corrent 0,5 µg/µl en el *BioAnalyzer 2100*. El perfil ideal que s'ha d'observar es resumeix a la figura 15, on la mitja del pes molecular dels fragments és aproximadament 150 bases (mida corresponent a l'interval de temps de lectura de 19-24 segons pel *BioAnalyzer 2100*).

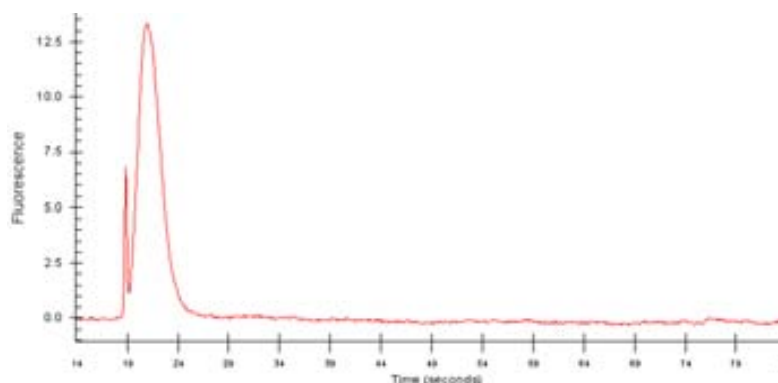


Figura 15. Electroferograma del *BioAnalyzer 2100* per cRNA fragmentats. Figura obtinguda del *GeneChip® Expression Analysis Technical Manual* (Affymetrix).

2.3.5 Hibridació dels microxips

Els cRNA es van hibridar en un microxip d'expressió *Human Genome U133 Plus 2.0* (Figura 16). Es van utilitzar 3 microxips diferents, per a les mostres no tractades, tractades amb HU i tractades amb HU i cafeïna.

S'agafaren 15 µg dels cRNA de cada tractament i es barrejaren amb una solució d'hibridació subministrada pel fabricant amb 10% (v/v) de DMSO (evita que els cRNA adoptin estructures secundàries) en un volum final de 300 µl. Les barreges s'escalfaren a 99 °C durant 5 minuts per assegurar-nos que les sondes fossin completament desnaturalitzades. Immediatament després, es reduí la temperatura a 45 °C durant 5 minuts. Aquest pas va ser necessari per a temperar la solució d'hibridació.

Els xips s'equilibraren amb 200 µl de solució de prehibridació. La seva aplicació es realitzà a través d'un dels porus en la part dorsal a l'estructura (figura 16) i s'incubaren 10 minuts a 45 °C en rotació.

S'eliminà la solució de prehibridació pels mateixos porus i s'afegí la solució d'hibridació fins que el xip romangué completament cobert. Els xips es posaren al forn d'hibridació a 45 °C durant 16 hores en rotació a 60 rpm.

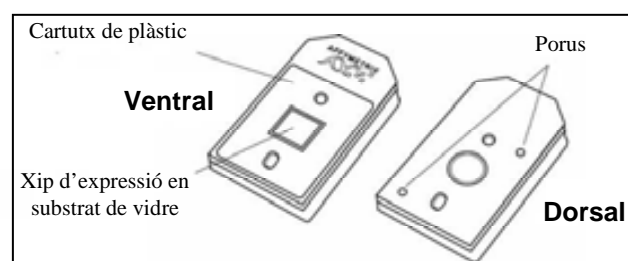


Figura 16. Microxip d'expressió *Human Genome U133 Plus 2.0*.

2.3.6 Rentats i tinció de les sondes.

Pels rentats i les tincions dels microxips s'utilitzà l'instrument *Fluidics Station 450* (Affymetrix) que es controla amb el programa *GeneChip® Operating Software* (Affymetrix) i permet fer tots els processos d'una manera automatitzada.

Els microxips es rentaren durant diferents cicles per eliminar l'excés de sondes i les unions inespecífiques. Seguidament, les sondes es marcaren amb estreptavidina (que s'uneix a la biotina present en els dNTP de les sondes de cRNA) conjugada amb el fluorocrom ficoeritrina. Per amplificar la senyal de les sondes, els microxips s'incubaren amb un anticòs

anti-estreptavidina de cabra i, posteriorment amb un anticòs anti-cabra biotinitada. Després de diferents rentats es tornaren a incubar amb estreptavidina-ficoeritrina que marcà ambdós, la biotina unida directament a la sonda i la unida a l'anticòs bionilat (figura 17).

2.3.7 Detecció de la fluorescència del microxip

La fluorescència es va enregistrar escanejant els microxips amb el *GeneChip® Scanner 3000* (Affimetrix).

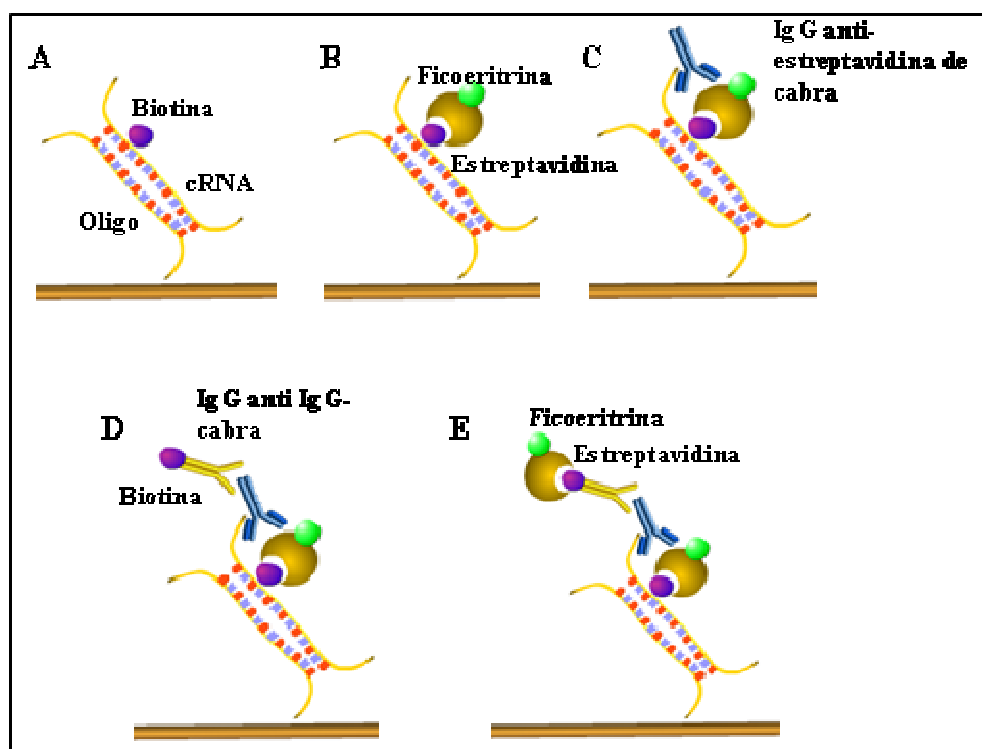


Figura 17. Hibridació, tinció de les sondes de cRNA i amplificació de la senyal. (A) Hibridació de les sondes cRNA marcats amb biotina amb els oligonucleòtids fixats a la superfície del microxip. (B) Reconeixement de les molècules de biotina per l'estreptavidina conjugada amb ficoeritrina. (C) Amplificació de la senyal fluorescent, reconeixement de les molècules d'estreptavidina per anticòs produïts en cabra. (D) Reconeixement de les IgG produïdes en cabra per anticòs contra la regió constant d'aquestes i conjugats amb biotina. (E) Reconeixement de les molècules de biotina conjugades a les immunoglobulines per estreptavidina marcada amb ficoeritrina.

2.3.8 Anàlisi

Per l'anàlisi dels resultats obtinguts amb els microxips d'expressió es va utilitzar el programa informàtic *ArrayAssist 5.5.1* (Stratagene). El sistema de normalització emprat fou el RMA (*Robust Microarray Analysis*) (Irizarry et al., 2003), que permet fer el càlcul de la

senyal d'expressió de les sondes de cadascun dels microxips d'una manera global multimostra; inclou tres passos:

- Correcció del soroll de fons.
- Normalització per quantils.
- Càlcul sumari de la senyal per set de sondes utilitzant una mediana polida.

Els resultats obtinguts amb aquest algoritme donen valors d'expressió absoluts en escala logarítmica (\log_2) que oscil·len entre 2 (les intensitats menors) i 14 (les majors).

Es van calcular els canvis d'expressió entre les diferents situacions de la següent manera:

- Cèl·lules tractades amb HU vs cèl·lules no tractades
- Cèl·lules tractades amb HU vs Cèl·lules tractades amb HU + cafeïna

Es va estimar que el canvi d'expressió considerat com a significatiu seria la mitja aritmètica dels canvis obtinguts per les sondes dels gens d'expressió constitutiva +/- tres vegades el seu error estàndard en la comparació entre tractament HU/ control negatiu. Per calcular-ho disposàvem d'una llista de 1442 sondes d'Affymetrix pels gens d'expressió constitutiva.

Els gens amb canvis d'expressió estadísticament significatius que seguien els criteris del model utilitzat, s'estudiaren amb el paquet informàtic *Ingenuity pathways* (Ingenuity Systems) (www.ingenuity.com). Aquest permet descobrir agrupacions de funcions i xarxes d'interaccions putatives entre els gens d'interès. Un cop introduïts els identificadors dels gens i els valors d'expressió el programa els identifica a la seva base de dades (*Ingenuity Pathway Knowledge Base*) i els assigna grups funcionals i les interaccions descrites a la literatura, generant les firmes gèniques. A partir d'un test de Fisher el programa calcula un valor p que indica si cada funció biològica assignada a una firma gènica és fruit de l'atzar. Per tant, l'anàlisi funcional descriu les funcions biològiques més representades per cada grup de gens. Les xarxes assignades pel programa són representades gràficament, es representen els gens introduïts amb enllaços entre ells, que representen les relacions biològiques reportades a la literatura que han d'haver estat publicades al menys en dos articles independents. Aquestes relacions poden ser directes o indirectes. Per tant el programa permet fer una estimació funcional global dels resultats.

2.4 Retrotranscripció dels RNA per PCR a temps real

Per fer les PCR a temps real es va realitzar una síntesi de cDNA de cadena senzilla a partir del RNA total. Prèviament els RNA es van tractar amb DNasa I per tal d'eliminar les restes de DNA genòmic que poguessin contaminar la mostra i evitar així la interferència en la reacció

de quantificació dels transcrits. S'utilitzà el kit *DNase I Amplification Grade* (Invitrogen). 10 µg de RNA de cada mostra van ser tractats amb 5 unitats de DNasa I en un volum final de 50 µl en tampó subministrat pel fabricant. Les reaccions s'incubaren a temperatura ambient al llarg de 15 minuts. Seguidament la DNasa I s'inactivà afegint 2,5 mM d'EDTA i incubant les mostres a 65 °C durant 10 minuts.

Per la retrotranscripció s'utilitzà el kit *High Capacity cDNA Archive* (Applied Biosystems). S'utilitzaren els 10 µg de RNA tractats amb DNasa I i se'ls hi afegí 2,5 unitats de retrotranscriptasa, 2,5 mM de cada dNTP, 150 ng d'encebadors formats per hexanucleòtids aleatoris i 1 unitat d'inhibidor de RNasa, en un volum final de 50 µl en tampó subministrat pel fabricant. Les reaccions s'incubaren 10 minuts a 25 °C i 120 minuts a 37 °C. Per inactivar la retrotranscriptasa, les reaccions s'incubaren 5 minuts a 85 °C. Finalment s'emmagatzemaren a -80 °C pel seu posterior ús.

2.5 PCR a temps real

Aquesta tècnica permet amplificar i detectar de forma simultània el producte amplificat a cada cicle ja que l'amplicó es visualitza determinant la senyal fluorescent a mesura que es va produint. L'increment de la intensitat de fluorescència a cada cicle és directament proporcional a la quantitat de producte generat, que alhora depèn de la quantitat inicial de motlle.

Es va realitzar PCR a temps real amb detecció amb *SYBR[®] Green* (Figura 18). El *SYBR[®] Green* és un fluorocrom que emet fluorescència només quan s'uneix al DNA de cadena doble, per tant la senyal va augmentant a mesura que es va amplificant el producte de la PCR durant la fase d'extensió. Mentre el DNA motlle estigui desnaturalitzat, és a dir, en forma de cadena simple, el *SYBR[®] Green* no el podrà unir ni emetre fluorescència. La unió del *SYBR[®] Green* al DNA es fa de forma estequiomètrica.

Per verificar els resultats d'expressió obtinguts en els microxips, es van fer PCR a temps real dels candidats seleccionats (taula 5). Per normalitzar els resultats es va utilitzar el rRNA 18S. Cada gen es va analitzar en els 3 tractaments corresponents (control negatiu, HU i HU + cafeïna) en dos experiments independents. Prèviament a l'anàlisi, es va confirmar que l'eficiència d'amplificació dels oligonucleòtids utilitzats pels gens diana i per l'estàndard eren similars.

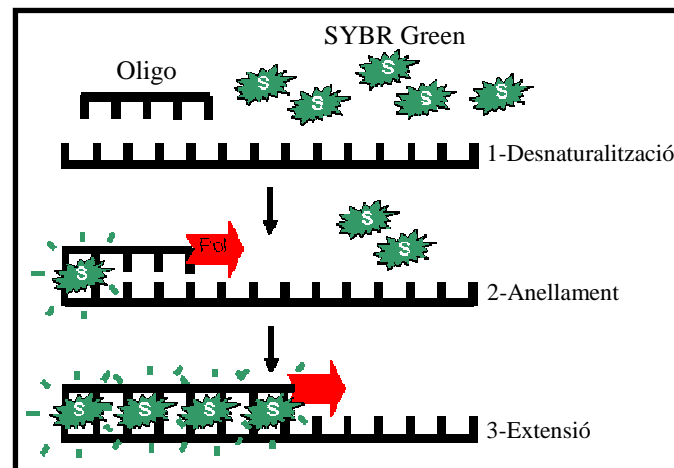


Figura 18. Esquema del funcionament a nivell molecular de la PCR en temps real basada en la detecció amb SYBR® Green. El fluorocrom emet quan s'uneix al DNA de cadena doble.

La seqüència dels oligonucleòtids utilitzats per cada gen van ser dissenyada de manera que almenys un dels oligonucleòtids hibridés entre dos exons del transcrit (*exon junction*), és a dir en una regió d'*splicing*. Així s'evità l'amplificació que provingués de restes de DNA genòmic de cèl·lules HeLa. Els oligonucleòtids utilitzats per l'amplificació es troben detallats a la taula 5.

En les reaccions d'amplificació a temps real s'utilitzaren 50 ng de cDNA amb 10 µl del reactiu 2x SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) i 200 nM dels oligonucleòtids adients (veure taula 5) en un volum final de reacció de 20 µl. Cada reacció de PCR es va establir per triplicat.

Les reaccions i la detecció de fluorescència es van realitzar amb l'equip ABI PRISM 7500 Real-Time System (Applied Biosystems). Les condicions d'amplificació per totes les reaccions de PCR a temps real van ser:

95 °C 10 minuts
○ 30 cicles
○ 95 °C 15 segons
○ 60 °C 1 minut

En tots els casos es va fer una corba de dissociació per assegurar-nos que no hi haguessin amplifícacions inespecífiques i que els oligonucleòtids no produïssin dimeritzacions entre ells.

Els resultats van ser analitzats amb el programa *7500 System Software* (Applied Biosystems) a través d'una quantificació relativa entre el control negatiu versus els tractaments.

Per establir si havien diferències estadísticament significatives entre l'expressió basal i l'expressió en condicions d'estrès replicatiu dels gens candidats a diana del checkpoint de fase S, s'aplicà una test t-Student.

2.6 Clonació del cDNA de la ciclina E2 en pLENTI4/V5-DEST

Per reproduir la sobreexpressió reportada a la literatura de la ciclina E2 en un gran número de tumors primaris i estudiar el seu efecte en la resposta al quimioteràpic camptotecina (CPT), es va procedir a l'obtenció de clons estables per la sobreexpressió de ciclina E2.

El primer pas consistí en la clonació del cDNA de la ciclina en el vector lentiviral pLENTI4/V5-DEST.

Es va adquirir el cDNA de la isoforma més llarga de la ciclina E2 clonada en el vector de clonació pENTR221 (Invitrogen) (figura 19A). A través del sistema *Gateway® Cloning* (Invitrogen), es va recombinar amb el vector lentiviral pLENTI4/V5-DEST (Invitrogen) (figura 19B) que permet una expressió constitutiva en cèl·lules de mamífer del cDNA clonat. Aquest sistema de clonació es basa en la recombinació homòloga a partir de les seqüències *att* que permeten transferir el cDNA d'un vector donador a un receptor. El pENTR221 presenta les seqüències *attL1* i *attL2* flanquejant el cDNA de la ciclina, mentre que el vector receptor, pLENTI4/V5-DEST, presenta les seqüències *attR1* i *attR2* flanquejant el gen *ccdB* que codifica per una proteïna tòxica per *E. coli*.

La reacció de recombinació LR es produeix de forma específica entre les seqüències *attL1-attR1* i *attL2-attR2*, donant lloc a seqüències *attB1/attB2* i *attP1/attP2* (figura 20).

El vector lentiviral presenta una etiqueta V5 a la regió contigua del lloc de recombinació, que permet construir proteïnes de fusió etiquetades. En el cas de l'ORF de la ciclina E2 no es produí ja que aquest integrava el seu codó de finalització.

Al transformar el producte de la recombinació en bacteris Stb3 (sensibles al gen tòxic *ccdB*) només creixeran aquells bacteris que hagin incorporat el pLENTI4/V5 degudament recombinat amb l'ORF de la ciclina E2.

Gens	Oligonucleòtids
BRCC3	F: CTGGCCGGTACTCTACACT R: GTGGACCATGAAGGGACTCT
CCNE2	F: TTATGACACCACCGAAGAGC R: TTATGACACCACCGAAGAGC
CLSPN	F: AGAACTGGAAGCCTTGAAGC R: CATCAGTGCCCATGTCTTTC
FGNL1	F: CAGGACCTACAGAACCAGCA R: TACTGGAGGTCCATGATCCA
HIST1HAC	F: GGAGACTCGAGGTGTGCTTA R: CATCCATGGCTGTGACAGTT
HIST1H2BG	F: CGAAGAAGGGTTCCAAGAAG R: CCTTGGATGAGATGCCAGTA
METT10D	F: TCGCAACAGAAGTGGATGAT R: TCTTTAAGAGCATCCATCAGGA
PIK3C2A	F: CGTGATGAGAAAGCTGAAGG R: CCTATTTGGCCTGGAGTAGG
PLEC1	F: AGCTGCTGAACTCCTCCAAG R: CTCCTTCTCATTCAGCCACA
RBM14	F: GTCATCGAGTGTGACGTGGT R: CTTTGGCATCTGCTTCCTTC
RCF3	F: GCAGATCAAGAAATCCCTGAG R: CAAGGAGCCTTTGTGGAGTT
SUPT16H	F: CGGCGAGTGAAGAGACTGTA R: GCATCAACGTTGGCATACTC
YWHAE	F: TACGACGAAATGGTGGAGTC R: CCAGGAGGCTCTTCTAGCTC
18S	F: AGTCCCTGCCCTTTGTACACA R: GATCCGAGGGCCTCACTAAAC

Taula 5. Oligonucleòtids utilitzats en les PCR en temps real.

Per dur a terme la recombinació es barrejaren 50 ng de pENTR221, 150 ng de pLenti4/V5-DEST i l'enzim LR Clonase™ II (Invitrogen) en un volum final de 10 µl en TE pH 8. La reacció s'incubà 1 hora a 25 °C.

Per eliminar l'activitat recombinasa la reacció fou incubada durant 10 minuts a 37 °C amb 2 µg de proteïnasa K.

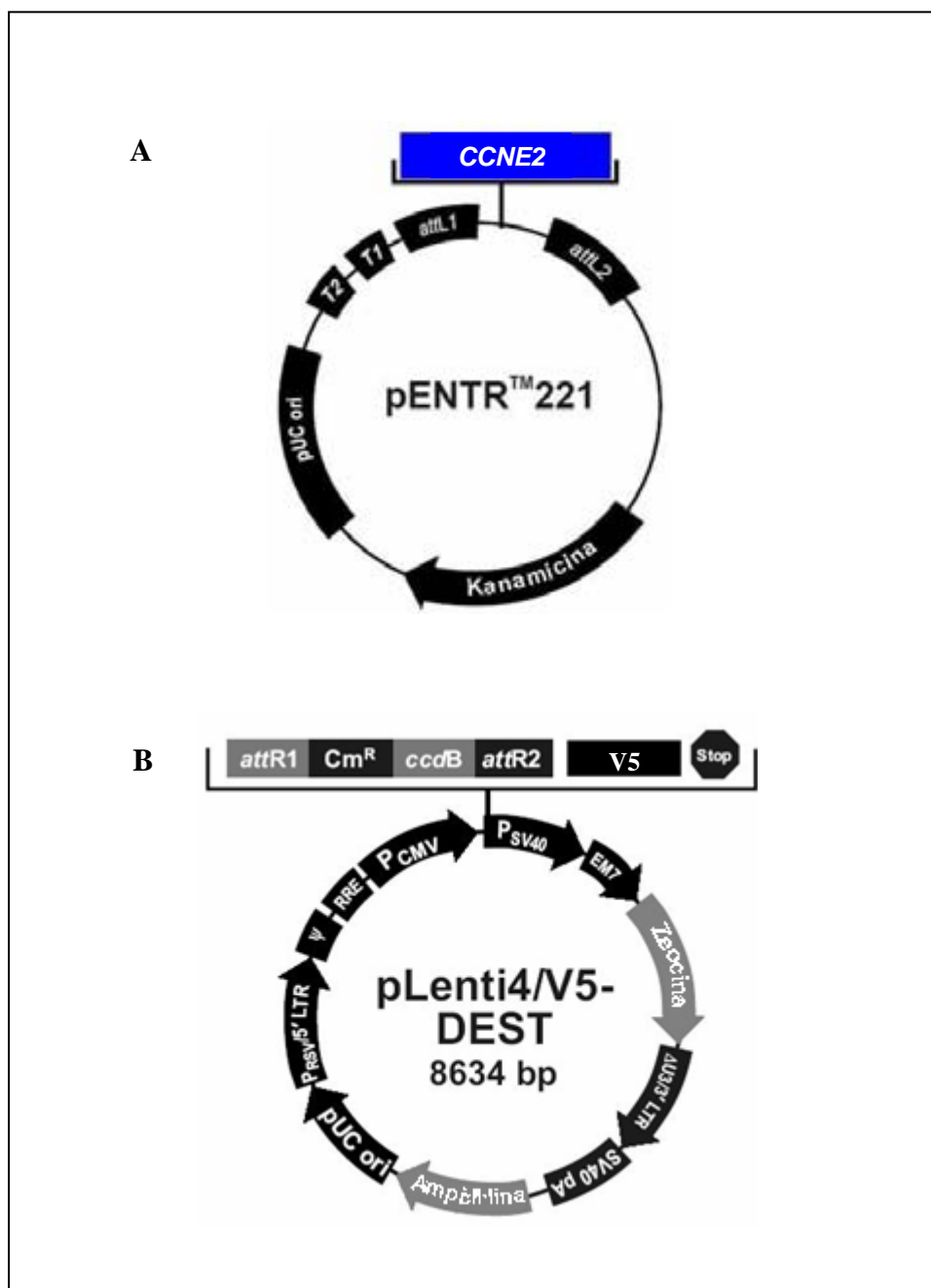


Figura 19. Es mostren els vectors utilitzats per la clonació de la ciclina E2 mitjançant el sistema Gateway. A) Vector donador que presenta l'ORF de la ciclina (CCNE2) flanquejat per les seqüències attL1 i L2 necessàries per la recombinació. B) Vector receptor d'expressió, on la ciclina E2 queda clonada entre les seqüències attR1 i R2. Un cop acabat el procés el vector perdrà el gen *ccdB* tòxic per *E. Coli* i la resistència a cloranfenicol (Cm^R).

Seguidament el producte de la recombinació s'utilitzà per transformar *E. coli* Stb13 (vegeu Materials i Mètodes 3.2). Aquesta soca permet l'estabilització de vectors amb repeticions terminals llargues, com les seqüències lentivirals, disminuint així les recombinacions inespecífiques.

2.6.1 Comprovació dels clons recombinants

Els bacteris *E. coli* de la soca Slb3 transformants foren sembrats en plaques de LB agar amb 100 µg/ml d'ampicil·lina.

El vector fou recuperat a partir de purificació de DNA plasmídic amb STET de colònies aïllades crescudes en medi LB líquid amb selecció per ampicil·lina (Materials i Mètodes 3.1.3).

Posteriorment, per comprovar la presència de l'ORF *CCNE2* (gen de la ciclina E2) i la seva correcta orientació en el vector lentiviral. S'escollí una estratègia de digestió que permetés diferenciar la orientació correcta del fragment, de forma que una diana estigués dins la seqüència de l'ORF de la ciclina E2 i una segona en la seqüència del vector. S'aconseguí amb la endonucleasa KpnI. Es digerí 1 µg de vector amb 1 unitat de KpnI en 20 µl finals en solució subministrada pel fabricant, s'incubà 1 hora a 37 °C. Per comprovar el patró de restricció es corregeren 100 ng en un gel d'agarosa 0,8% (vegeu Materials i Mètodes 3.4).

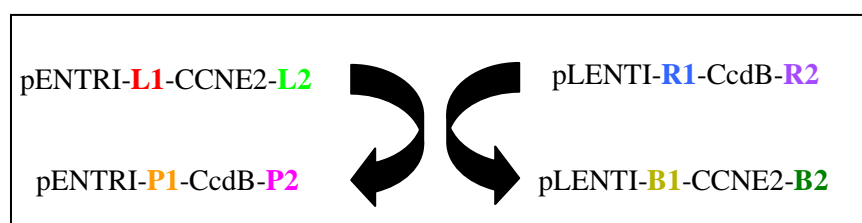


Figura 20. Recombinació de les seqüències LR pel sistema *Gateway Cloning*. Les seqüències L del vector donador recombinen amb les R del vector receptor, generant noves seqüències P en el vector donador i B en el receptor.

2.7 Tractaments per avaluar l'activitat de la expressió gènica induïda pel *checkpoint*

Es sembraren 6×10^5 cèl·lules HeLa per pou en plaques de sis pous (80% de confluència). Densitat a la qual les cèl·lules continuen ciclant i impeding així la inhibició de creixement per contacte.

Es deixaren a 37 °C, 5% (v/v) CO₂ 12 hores, per tal que les cèl·lules HeLa s'adherissin a la superfície de les plaques de cultiu. Seguidament es procedí a l'aplicació dels tractaments recollits a la figura 21. Així es disposà de cèl·lules no tractades (com a control negatiu), cèl·lules tractades amb HU on s'activarà el *checkpoint* de fase S i cèl·lules tractades amb HU i cafeïna, on la cafeïna és un inhibidor de les quinases ATR i ATM, per tant els transductors centrals no es podran activar i el mecanisme de supervivència no podrà generar la seva resposta, malgrat les condicions d'estrès replicatiu.

Les cèl·lules HeLa amb els respectius tractaments s'incubaren durant 4 hores a 37 °C i 5% (v/v) CO₂.

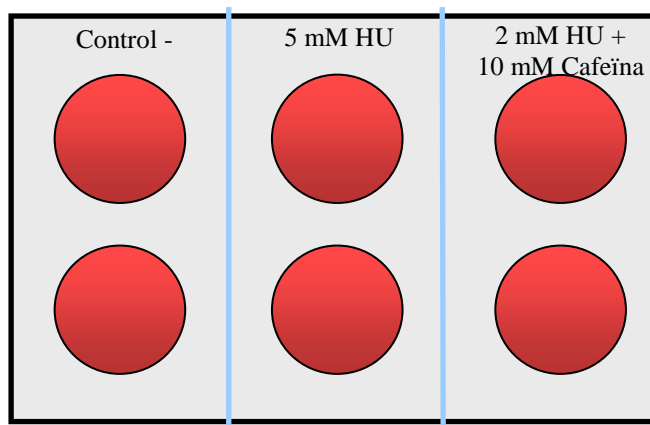


Figura 21. Tractaments emprats en cèl·lules HeLa per induir l'activació (HU) o inhibició (HU+cafeïna) del *checkpoint* de fase S.

2.7.1 Sincronització cel·lular en la transició G1/S

Per estudiar la ciclina E2 com a diana del *checkpoint* de fase S es van sincronitzar els cultius cel·lulars de cèl·lules HeLa i HEK293T en la transició G1/S utilitzant un doble bloqueig de timidina (Cao et al., 1991; Tobey et al., 1967).

La timidina és un precursor del DNA que quan s'afegeix en excés als cultius provoca un desbalanç en els nivells de dNTP endògens inhibint la replicació.

Es sembraren 6×10^5 cèl·lules HeLa i 5×10^5 cèl·lules HEK293T en plaques de 60x15 mm en 3 ml de medi complet en presència de 2 mM de timidina. Els cultius s'incubaren 19 hores a 37°C i 5% (v/v) CO₂. Degut a què un únic tractament amb timidina només enriqueix parcialment les cèl·lules en la transició G1/S, es procedí a un segon bloqueig després de 8 hores de recuperació en medi complet, seguidament s'inicià el segon bloqueig incubant els cultius amb 2 mM de timidina durant 16 hores.

2.7.2 Alliberament dels cultius sincrònics

Els cultius cel·lulars de HeLa i HEK293T s'alliberaren de forma sincrònica en una fase S no pertorbada, en condicions d'estrès replicatiu generat per l'addició de 5 mM d'HU o en condicions d'estrès replicatiu amb el *checkpoint* inhibit (5 mM HU i 10 mM cafeïna).

Les cèl·lules es recolliren cada 2 hores en les diferents condicions des de l'alliberament fins un total de 14 hores (figura 22A), per tal de fer estudis per citometria i WB.

Per tal d'estudiar el mecanisme pel qual el *checkpoint* de fase S estabilitza la ciclina E2 s'alliberaren cultius sincrònics en presència d'HU, 10 hores després s'afegiren 50 µg/ml de cicloheximida (CHX) per tal d'inhibir el procés de traducció. S'agafaren mostres cada 30 minuts fins un total de 2 hores (figura 22B).

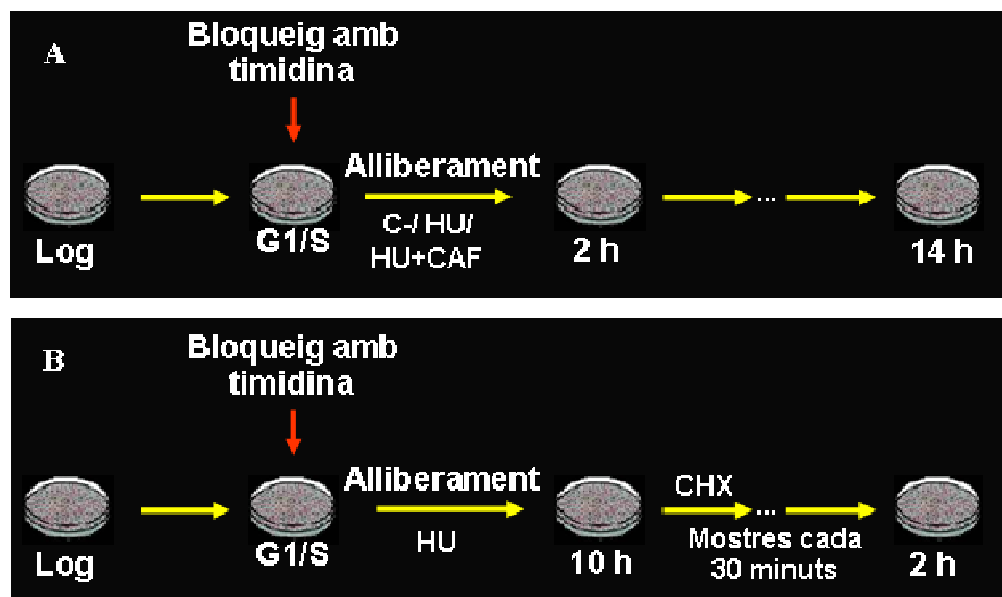


Figura 22. Esquemes de l'experiment de validació de la ciclina E2 com a diana del *checkpoint* de fase S. Els cultius de HeLa i HEK293T foren sincronitzats en la transició G1/S, (A) s'alliberaren en fase S no pertorbada, estrès replicatiu o en condicions d'estrès amb el *checkpoint* inhibit. (B) S'alliberaren en condicions d'estrès replicatiu i 10 hores després s'inhibí el procés de traducció. Log, fase de creixement exponencial.

2.8 Citometria de flux activada per fluorescència (FACS)

Es va utilitzar la tècnica de FACS per analitzar el cicle cel·lular en els cultius de cèl·lules per confirmar el grau de sincronització en G1/S i la posterior progressió sota diferents condicions de tractament.

Les cèl·lules en cultiu es van tripsinitzar per separar-les de la superfície de les plaques de cultiu i es comptaren en un hemocitòmetre de Neubauer.

S'agafà el volum corresponent a 10^6 cèl·lules. S'eliminà el medi centrifugant a 500 g durant 5 minuts a temperatura ambient. Per eliminar les traces de medi els pellets cel·lulars es redissolgueren en PBS fred (140 mM NaCl; 74,5 mM KCl; 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 10 mM Na_2HPO_4 pH 7,4) i es tornà a centrifugar en les condicions descrites. Les cèl·lules es redissolgueren en 200 μl de PBS fred i es fixaren afegint gota a gota 4 ml d'etanol 70% fred en agitació. Les reaccions es conservaren a 4 °C com a mínim 12 h.

Es procedí a centrifugar les cèl·lules fixades a 500 g durant 5 minuts i s'eliminà la solució de fixació. Per tal d'eliminar les restes d'etanol i rehidratar les cèl·lules es feren dos rentats amb PBS.

Finalment, els pellets cel·lulars es redissolgueren en PBS amb 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de iodur de propidi i 140 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'RNasa per eliminar l'RNA, ja que pot interferir en la lectura del contingut de DNA. Les reaccions s'incubaren 30 minuts a 37°C.

Les lectures es van realitzar de la mateixa manera que en els FACS de *S. cerevisiae* (Materials i Mètodes 1.3.5).

2.9 Obtenció de clons estables d'expressió constitutiva per ciclina E2 en cèl·lules HeLa

Un cop obtingut el vector d'expressió de la ciclina E2 (vegeu Materials i Mètodes 2.6), es procedí a la generació de les partícules lentivirals i la posterior transducció de les cèl·lules HeLa.

2.9.1 Producció dels lentivirus

Es van co-transfectar cèl·lules de la línia 293FT amb els vectors empaquetadors, que codifiquen pels gens de les proteïnes de la càpside vírica i els vectors lentivirals per encapsidar (pLENTI4/V5-DEST-CCNE2 o pLENTI4/V5-DEST-LacZ com a control negatiu).

El dia previ a la transfecció es sembraren en medi sense antibiòtics 5×10^6 de cèl·lules en plaques de 10 cm de diàmetre en les condicions explicades a Materials i Mètodes 2.2.1, per generar una confluència del 90-95%. S'incubaren a 37 °C i 5% CO_2 durant la nit.

El matí següent, es realitzà la transfecció amb Lipofectamina 2000 (Invitrogen) seguint les instruccions del fabricant.

Es barrejaren 3 µg de cada vector que conté els gens que codifiquen per les proteïnes de la càpside lentiviral (pLP1, pLP2, pLP/VSVG) i 3 µg dels vectors lentivirals d'expressió (pLENTI4/V5-DEST-CCNE2 o pLENTI4/V5-DEST-LacZ) amb 36 µl de Lipofectamina 2000 en un volum final de 3 ml de medi Opti-MEM (Invitrogen). Les reaccions s'incubaren durant 20 minuts a temperatura ambient.

Els 3 ml de cada reacció s'aplicaren a les plaques corresponents de cèl·lules HEK293FT en un volum final de 8 ml en medi complet fresc sense antibiòtics.

Després de 24 hores es reemplaçà el medi amb els complexos DNA-Lipofectamina 2000 per medi complet sense antibiòtics.

Finalment, a les 48 i 72 hores després de la transfecció es recolliren els sobrenedants dels cultius que contenien els lentivirus en suspensió i foren filtrats amb membranes de 45 µm, per tal d'eliminar possibles cèl·lules i restes de les mateixes. Després es centrifugaren a 500 g durant 15 minuts per eliminar les restes cel·lulars. Els sobrenedants es guardaren a -80 °C pel seu posterior ús.

2.9.2 Transducció de les cèl·lules HeLa i selecció dels clons positius

El dia previ a la transducció es sembrà en plaques de 6 pous el número adient de cèl·lules HeLa per a què l'endemà presentessin una confluència del 30% (2×10^5 cèl·lules) en les condicions ja explicades a Materials i Mètodes 2.2.1, en medi sense antibiòtic.

El matí següent s'afegiren als cultius 500 µl dels sobrenedants totals recollits amb els lentivirus corresponents (pLENTI4/V5-DEST-CCNE2 i pLENTI4/V5-DEST-LacZ) i polibré a una concentració final de 10 µg/ml. Aquest compost és un polímer catiònic que redueix la càrrega de repulsió entre els virions i l'àcid siàlic de la superfície cel·lular, incrementant així l'eficàcia de la transducció (Davis et al., 2004).

Després de 24 hores d'incubació a 37 °C i 5% CO₂ els cultius foren diluïts a 1/2, 1/3 i 1/5 en plaques de 10 cm de diàmetre.

Per seleccionar els clons positius les cèl·lules transduïdes es cultivaren en medi complet i 500 µg/ml de zeocina durant 3 setmanes (concentració obtinguda a partir d'una corba de mortalitat en cèl·lules HeLa).

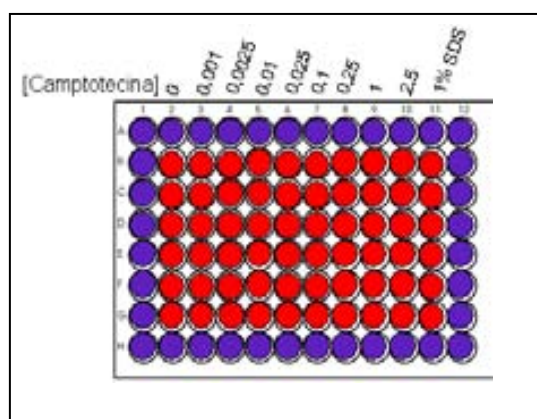
Els clons van ser aïllats i expandits. Finalment els clons foren confirmats testant la sobreexpressió de la ciclina E2 mitjançant tècniques de western blot (vegeu Materials i Mètodes 2.13).

2.10 Assaig de viabilitat cel·lular

Amb l'objectiu d'estudiar si la sobreexpressió de la ciclina E2 confereix canvis en la sensibilitat envers quimioteràpics que actuen sobre el DNA i, en conseqüència, sobre el procés de la replicació, es van realitzar assaigs de citotoxicitat comparant la corba de viabilitat cel·lular obtinguda pels cultius en resposta a camptotecina (CPT) de HeLa control i de HeLa que sobreexpressaven constitutivament la ciclina E2.

Es van realitzar tres experiments independents en els que s'utilitzaren dos clons de cèl·lules HeLa transfectades amb el vector buit i dos clons que sobreexpressaven la ciclina E2. Cada clon es sembrà en una placa de 96 pous com es mostra a la figura 23.

Figura 23. Representació de la sembra dels diferents clons de cèl·lules HeLa en plaques de 96 pous. Per cada clon testat s'utilitzà una placa. En els pous blaus s'addiconà PBS. En els pous vermells es sembraren les cèl·lules HeLa. En cada columna s'afegí una concentració diferent de camptotecina (indicada al gràfic) que anava de 0 a 2,5 ng/ml. A l'última columna s'afegí 1% de SDS com a 100% de mortalitat.



Es sembraren 2000 cèl·lules en cada pou de la placa en un volum de 50 µl de medi complet sense zeocina. S'incubaren a 37 °C i 5% CO₂ durant 12 hores perquè les cèl·lules s'adherissin a la superfície de cultiu. Abans de posar els tractaments es determinà la viabilitat cel·lular de la placa corresponent al temps inicial, que ens va permetre estimar la quantitat de cèl·lules inicials que es sembraren per a cada clon. Seguidament s'afegiren concentracions ascendents de CPT per columna, en un volum final de cultiu de 100 µl. Com s'aprecia a la figura 23 s'utilitzaren 6 rèpliques per cada concentració dins de cada experiment.

Després de tres dies, en cada pou s'afegí el colorant bromur de 3-(4,5-Dimetil-2-Tiazolil)-2,5-difeniltetrazoil (MTT) a una concentració final de 0,5 mg/ml. Les reaccions s'incubaren 4 hores a 37 °C i 5% CO₂. Les cèl·lules vives i metabòlicament actives són capaces de reduir el MTT de color groc soluble, a cristalls de formazan, compost blau insoluble (Mosmann, 1983). La reacció és catalitzada per l'enzim succinat deshidrogenasa mitocondrial.

S'eliminà el medi dels pous i els cristalls insolubles de formazan van ser dissolts en 180 µl de DMSO.

Les reaccions colorimètriques foren llegides en un lector de plaques (Sunrise, Tecan) a una longitud d'ona de 590 nm.

Primer es va calcular la viabilitat cel·lular de cada pou utilitzant la següent fórmula:

$$\% = \frac{(T1/T0)-(X/T0)}{(C/T0)-(X/T0)} \times 100$$

Ti absorvànies de les cèl·lules tractades amb una dosi determinada de camptotecina, T0 absorvànica mitja de les cèl·lules en el moment de començar el tractament, C absorvànica mitja de les cèl·lules sense tractar i X absorvànica mitja del 100% de mortalitat cel·lular.

Als resultats de viabilitat de cada clon tractades amb diferents concentracions de CPT se'ls aplicà un anàlisi estadístic amb el programa informàtic *GraphPad* que consistí en ajustar les dades a una corba de regressió dosi-resposta no lineal. D'aquesta manera interpolant a la gràfica el 50% de viabilitat es calculà el IC50 per a cada clon. Aquest valor indica la concentració del quimioteràpic que redueix la viabilitat cel·lular un 50% respecte el control.

Per determinar si la sobreexpressió de ciclina E2 confereix canvis en la sensibilitat a CPT, es va aplicar el test t *d'Student* per avaluar la significança de les diferències en els IC50 dels clons i els controls negatius.

2.11 Extracció de proteïnes en cèl·lules de mamífer

Les cèl·lules cultivades van ser rascades de la superfície de les plaques de cultiu. Es recolliren en PBS i foren pelletejades centrifugant a 500 g durant 5 minuts.

Els pellets cel·lulars es redissolgueren en 100-150 µl de tampó de lisi (50 mM Tris-HCl pH 7,7; 150 mM NaCl; 10% glicerol; 1 mM EDTA; 1% NP-40; 2 mM NaF; 2 mM β-glicerofosfat de sodi; 0,5 mM Na₃VO₄; 0,5 mM pirofosfat de sodi; 1 mM PeFaBloc; 1 µM leupeptina; 0,15 µM aprotinina). Les reaccions s'incubaren 1 hora en gel. Seguidament es procedí a la clarificació dels extractes centrifugant-los a 15000 g a 4 °C durant 10 minuts. Els sobrenedants van ser quantificats i congelats a -80°C pel seu ús posterior.

2.12 Quantificació de la concentració de proteïna

Es va fer una quantificació de proteïna semblant a la explicada anteriorment, també es tracta d'un *Lowry* modificat, però el reactiu emprat en aquest cas ens va permetre quantificar volums de 2 µl dels extractes. S'utilitzà el kit *BCA Protein Assay* (Pierce). Els extractes es diluïren 12,5 vegades i es posaren en plaques de 96 pous amb els estàndards

fets a partir de dilucions d'albumina de sèrum boví (0,025; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2 mg/ml). S'afegiren 200 µl del reactiu del kit i s'incubaren 30 minuts a 37 °C. Les plaques es llegiren en un lector d'ELISA (Sunrise, Tecan) a una longitud d'ona de 620 nm.

2.13 Western Blot

El WB s'utilitzà per avaluar l'estat de fosforilació de la proteïna CHK1 que indica l'activitat del mecanisme de vigilància de la integritat genòmica, així com per l'estudi de la ciclina E2 com a diana del *checkpoint*.

Es carregaren 30 µg de proteïna total dels extractes cel·lulars amb tampó d'aplicació de proteïnes per electroforesi (50mM Tris-HCl pH 6,8; 8% (v/v) glicerol; 4% (v/v) 2-mercaptoetanol; 1,6% (v/v) SDS; 0,008% (p/v) blau de bromofenol) en gels desnaturalitzants d'acrilamida 12% (v/v) (relació acrilamida/bisacrilamida 37,5:1). Les electroforesi es van córrer a 150 V durant 1,5 hores en tampó de carrera (25 mM Tris-glicina pH 8,3, 0,1 % (p/v) SDS).

El següent pas consistí en la electrotransferència de les proteïnes a membranes de PVDF (0,45 µm, Millipore) prèviament activades amb metanol. S'utilitzà el sistema de transferència d'immersió MiniProtean III (BioRad). Es transferiren a 400 mA durant 1 hora en tampó *Towbin* modificat (50 mM Tris-glicina pH 9,1; 0,0373% (p/v) SDS; 20% (v/v) metanol). Els passos següents foren els mateixos descrits a Materials i Mètodes 1.14.

Els anticossos primaris i secundaris emprats així com les seves dilucions es recullen a la taula 4.

3. TÈCNIQUES GENERALS

3.1 Preparació d'*E. coli* quimiocompetents

Es va sembrar *E. coli* en medi sòlid LB (1% bactotripton, 0,5% d'extracte de llevat, 1% NaCl y 1,5% d'agar) i es va incubar tota la nit a 37 °C. Al dia següent s'inoculà una colònia individual en 20 ml de LB líquid, incubant-lo a 37 °C amb agitació (220 RPM) durant la nit.

Al matí següent s'agafaren 2 ml del cultiu i s'inocularen en 200 ml de medi Ψ (veure Materials i Mètodes 1.3.1). El cultiu novament s'incubà a 37 °C amb agitació fins que s'assolí una densitat òptica a 550 nm de 0,48 (cultiu en fase exponencial).

Seguidament es va refredar el cultiu en glaç i es van recollir les cèl·lules centrifugant a 4000 g durant 5 minuts a 4 °C. Les cèl·lules es van resuspendre en 80 ml de la solució TfbI freda (30 mM acetat de potassi; 100 mM clorur de rubidi; 10 mM clorur de manganès; 15% (v/v) glicerol; pH 5,8), i novament es van centrifugar en les mateixes condicions. El pellet es resuspenguè en 8 ml de TfbII fred (10mM de MOPS; 10 mM de clorur de rubidi; 15% (v/v) glicerol; pH 6,5). Les cèl·lules es deixaren 15 minuts en gel. Finalment s'aliquotaren en volums de 100 µl i s'emmagatzemaren a -80 °C.

3.2 Transformació química d'*E. coli*

A 100 µl de cèl·lules quimiocompetents, utilitzant la soca adient en cada cas, s'hi afegiren 50 ng del vector corresponent. La barreja s'incubà 30 minuts en glaç.

Les cèl·lules es transformaren per xoc tèrmic a 42 °C durant 90 segons. Immediatament s'afegí 1 ml de medi líquid LB (1% bactotripton; 0,5% d'extracte de llevat i 1% NaCl) i s'incubà 1 hora a 37 °C amb agitació, per permetre l'expressió de la resistència a ampil·lina, cloramfenicol o kanamicina, segons el vector introduït. Finalment les cèl·lules es sembraren en plaques LB amb 100 µg/ml d'ampil·lina, 30 µg/ml de cloramfenicol o 50 µg/ml de kanamicina.

3.3 Extracció del DNA plasmídic amb STET

Les colònies resistents a l'antibiòtic de selecció corresponent es van picar i es van inocular en cultius líquids de 4 ml de LB amb 100 µg/ml d'ampil·lina, 30 µg/ml de cloramfenicol o 50 µg/ml de kanamicina, per tal d'obtenir cultius saturats dels bacteris transformants. S'incubaren a 37 °C amb agitació durant la nit.

El matí següent s'agafaren 1,3 ml dels cultius per portar a terme l'extracció dels vectors corresponents. Els bacteris es van pelletejar i es resuspengueren amb 0,5 ml de tampó STET (8% (p/v) sacarosa; 50 mM Tris·HCl pH 8,0; 50 mM EDTA; 0,1% (v/v) Tritó X-100) complementats amb 100 µg/ml de lisozim per digerir les parets bacterianes. Les suspensions es deixaren reposar 10 minuts a temperatura ambient.

Seguidament les mostres es bulliren 45 segons per tal de lisar les cèl·lules i permetre la sortida del DNA plasmídic. Es realitzà una centrifugació a 16000 g durant 10 minuts per eliminar les restes cel·lulars. El DNA plasmídic es va insolubilitzar afegint un volum d'isopropanol durant 15 minuts en gel. Les mostres es centrifugaren a 16000 g durant 20

minuts i s'eliminà el sobrenedant completament. El pellet de DNA es rentà amb etanol 70% (v/v). Es va fer una nova centrifugació sota les mateixes condicions i s'eliminà completament l'etanol.

El DNA s'acabà resuspenent amb 100 µl de TE amb 10 µg/ml de RNasa A per eliminar totalment el RNA co-purificat. La barreja s'incubà 3 hores a 37 °C.

3.4 Electroforesi d'àcids nuclèics

Les comprovacions dels productes de PCR obtinguts, les digestions dels vectors i la integritat dels RNA per les PCR a temps real es van fer a través d'electroforesi en gels d'agarosa al 0,8% (p/v). Per fer-los es diluí l'agarosa (D-1 Low EEO-GQT, Pronadisa) en TAE (40 mM Tris-acetat; 1 mM EDTA; pH 8,0) i 0,5 µg/ml de bromur d'etidi que és un agent intercalant que s'uneix als àcids nuclèics de forma estequiomètrica i emet fluorescència en ser excitat amb llum ultraviolada.

S'utilitzà com a marcador de pes molecular el DNA del fag λ digerit amb BstEII (New England Biolabs).

Els gels es van córrer a 5 V/cm. El DNA es visualitzarà exposant els gels en un transil·luminador de llum ultraviolada (365 nm). L'emissió de llum va ser captada per una càmera fotogràfica (Canon Power Shot G5).

Resultats

“L’investigador pateix les decepcions, els llargs mesos passats en la direcció equivocada, els fracassos. Però els fracassos són sempre útils, perquè, ben analitzats, poden conduir a l’èxit”

Alexandre Fleming (Biòleg)

**IDENTIFICACIÓ DE DIANES DEL *CHECKPOINT* DE FASE S
MITJANÇANT APROXIMACIÓ PROTEÒMICA: TÈCNICA 2D-DIGE**

Amb l'objectiu d'identificar noves dianes del mecanisme de vigilància de la integritat genòmica es va decidir, en una primera aproximació, la utilització d'un estudi a gran escala a partir de tècniques proteòmiques.

Les proteïnes centrals del *checkpoint* de fase S són proteïnes quinasa que en activar-se generen la resposta a través d'una cascada de fosforilacions. Per identificar noves dianes del *checkpoint* de fase S es va procedir a la utilització de la tècnica 2D-DIGE (veure Material i Mètodes 1.15) que permet identificar canvis induïts a nivell de proteïna ja siguin per acumulació, degradació o modificacions post-traduccionals.

Degut a la complexitat del proteoma humà, s'elegí *S. cerevisiae* com a model experimental, ja que presenta un proteoma més simplificat, alhora que presenta una elevada conservació les rutes implicades en el control del cicle cel·lular (veure Materials i Mètodes 1.1).

1.1 Construcció i comprovació de la soca defectiva pel *checkpoint* de fase S per deleció del transductor central *MEC1*

Per identificar dianes del *checkpoint* d'integritat genòmica en *S. cerevisiae* mitjançant la comparació proteòmica, el primer pas consistí en l'obtenció d'una soca salvatge que pogués activar el *checkpoint* de fase S i una soca deficient pel mecanisme.

La soca deficient es va construir per deleció completa del gen *MEC1* (ortòleg d'ATR humà), que codifica pel transductor central del *checkpoint* de fase S. Tanmateix *MEC1* és un gen essencial per a les cèl·lules, és a dir, que la seva deleció és letal (figura 24).

Això es deu al fet que una funció de Mec1p independent de la resposta del *checkpoint* de fase S, és regular la proteïna Sml1 que actua com a fre en la síntesi de dNTP interaccionant amb les ribonucleotidilreductases (Rnr). Si es delecta únicament *MEC1*, la proteïna Sml1p està constitutivament activada i, com a conseqüència, la síntesi de dNTPs queda inhibida. És sabut que la deleció de *SML1* permet la viabilitat dels mutants *mec1Δ* (Zhao et al., 1998). A més, els mutants *sml1Δ* no presenten cap fenotip apreciable i tenen una resposta del *checkpoint* intacte (Tercero and Diffley, 2001).

En qualsevol cas, per tal d'assegurar-nos que els canvis observats en comparar els proteomes fossin exclusivament deguts a l'activació del *checkpoint*, es va treballar amb soques isogèniques: *MEC1+ sml1Δ* vs *mec1Δ sml1Δ*.

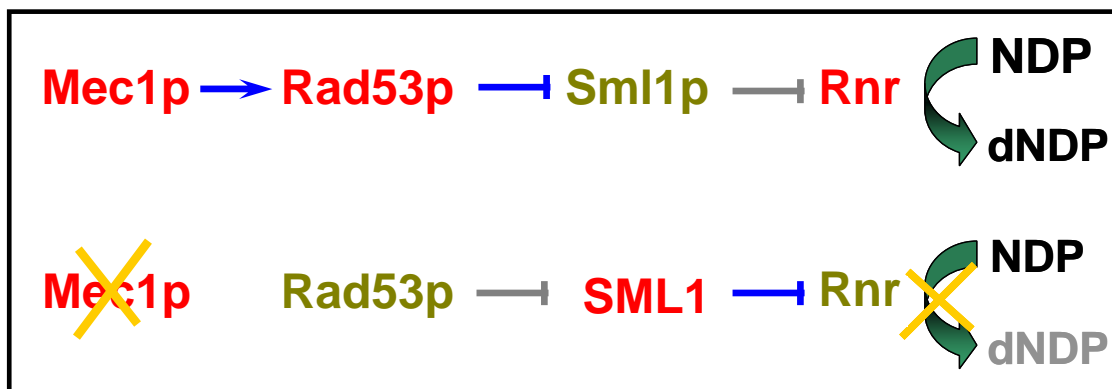


Figura 24. Regulació que exerceix Mec1p, de manera independent del checkpoint de fase S, sobre Sml1p. La deleció de *MEC1* provoca l'activació constitutiva de la proteïna que inhibeix la síntesi de dNTP, impedit així la viabilitat cel·lular.

La soca salvatge pel *checkpoint* de fase S amb la deleció de *SML1* va ser cedida pel Dr. J. A.

Tercero (Tercero and Diffley, 2001). A partir d'aquesta es delectonà *MEC1* per obtenir la soca deficient en la resposta del *checkpoint* (veure Material i Mètodes 1.4.1) i es va substituir pel marcador auxotròfic *URA3*. Els clons capaços de créixer en absència d'uracil al medi, es van sotmetre a una PCR de comprovació per confirmar l'eliminació de *MEC1* (veure Materials i Mètodes 1.6.1). Els oligonucleòtids utilitzats anellen en els flancs del locus, així que a la PCR de la soca progenitora s'obtingué una banda de 7 Kb, corresponent al locus *MEC1*, mentre que a la soca *mec1Δ::URA3* s'obtingué una banda de 2,2 Kb

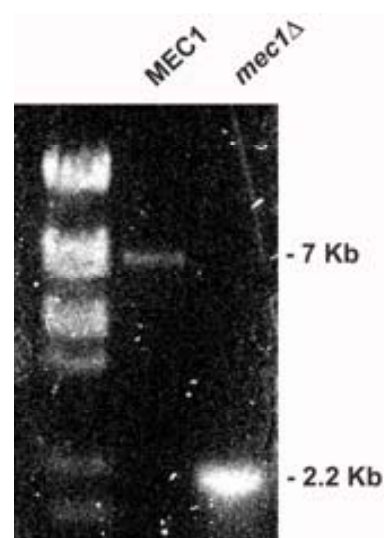
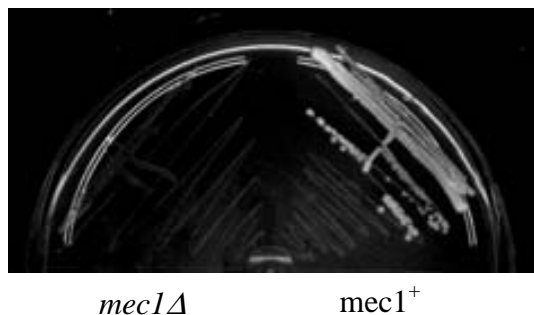


Figura 25. Comprovació de l'estat del locus *MEC1* per PCR

corresponent al gen *URA3* (figura 25), indicant d'aquesta manera que el transductor central del *checkpoint* de fase S en llevat de gemmació s'havia delectonat correctament.

Adicionalment, es va portar a terme una comprovació funcional de la deleció de *MEC1*, analitzant la sensibilitat a HU, molècula que genera estrès replicatiu per la depleció dels dNTP endògens. A partir d'un clon es van sembrar estries en plaques de medi ric (YPD) suplementat amb 0,2 M HU. Com mostra la figura 26, la soca *mec1Δ* no és viable en condicions generadores d'estrès replicatiu. Es comprovà també que la deleció de *sml1Δ* no afecta la viabilitat cel·lular en aquestes mateixes condicions. Totes dues soques creixen normalment en YPD (no es mostra).

Figura 26. Prova funcional del comportament de les soques en condicions d'estrès replicatiu



1.2 Obtenció de les mostres per l'anàlisi proteòmic

Per realitzar l'anàlisi proteòmic es realitzaren quatre experiments independents, cadascun com es descriu a continuació:

1.2.1 Sincronització cel·lular dels cultius *MEC1+* i *mec1Δ*

Per tal d'assegurar que les cèl·lules dels cultius entressin sincrònicament en fase S, reduint així possibles diferències degudes a factors independents del *checkpoint*, els cultius de les soques *MEC1+* i *mec1Δ* van ser sincronitzats utilitzant la feromona natural de *S. cerevisiae*, factor α , que atura el cicle cel·lular a finals de la de fase G1 en cèl·lules haploides de l'haplotip "a" (veure Materials i Mètodes 1.1 i 1.8).

La correcta sincronització cel·lular es va verificar en primer lloc mesurant l'índex de gemmació (IG) (vegeu Materials i Mètodes 1.7).

En la figura 27A, es mostren els percentatges de gemmació dels cultius, en tots els casos era inferior al 7% indicant que el número de cèl·lules en fase G1 (no gemmades) era superior al 90% després del tractament amb factor α . Cal destacar, que totes les cèl·lules gemmades comptades presentaven una morfologia *dumbbell*, és a dir, moment en què la gemma és pràcticament tant gran com la cèl·lula mare, indicant que es trobaven completant la mitosi. A la figura 27B s'observa la mitjana dels índex de gemmació obtinguts per cada soca en els quatre experiments independents. Tot i que la soca *mec1Δ* presenta un petit retard en el cicle respecte la soca salvatge, com s'aprecia en el comptatge de cèl·lules gemmades, les diferències no són estadísticament significatives, indicant així que els dos cultius són comparables.

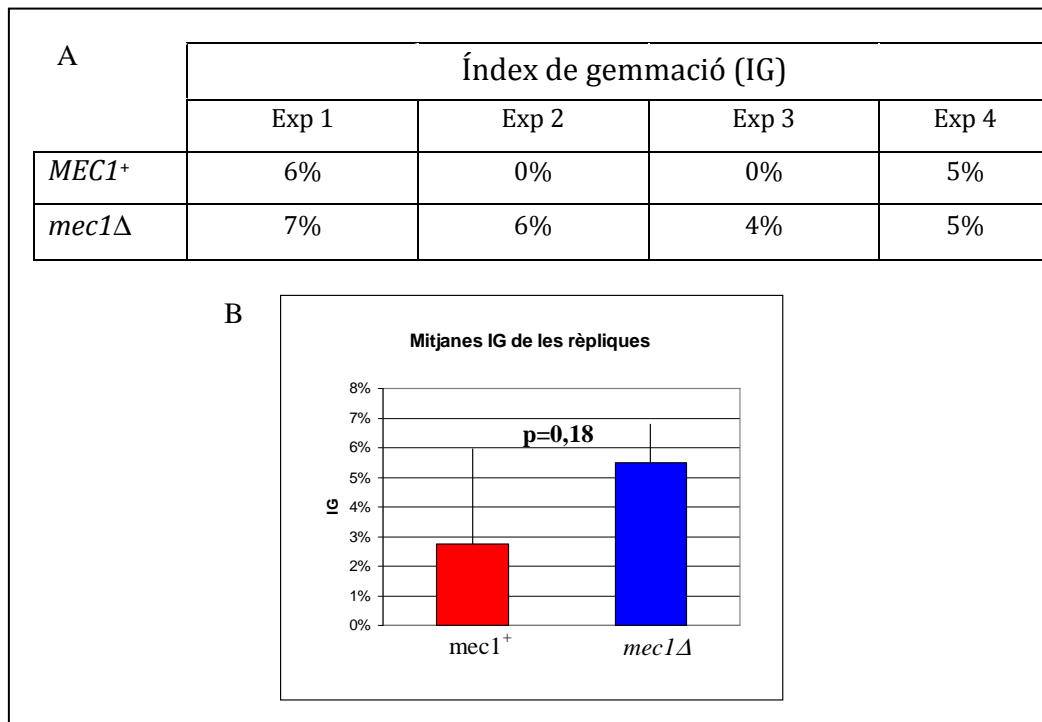


Figura 27. Índex de gemmació dels cultius sincronitzats en fase G1. (A) Valors dels IG de les quatre parelles experimentals. (B) Representació de la mitja dels IG dels quatre experiments independents de cada soca.

Adicionalment, per confirmar la sincronització dels cultius es realitzà un assaig de citometria de flux activada per fluorescència (FACS). Aquesta tècnica permet mesurar el contingut de DNA de les cèl·lules dels cultius i estimar així la fase del cicle en la que es troben (veure Materials i Mètodes 1.10).

A la figura 28 es mostren els perfils obtinguts per citometria d'una de les parelles experimentals.

Els cultius en creixement exponencial (figura 28A) mostren dos pics, un corresponent a un contingut haploide (1C) de DNA (fase G1) i l'altre corresponent a un contingut replicat (2C) de DNA (fase G2/M). La regió entre els dos pics mostra un contingut intermedi de DNA, corresponent a cèl·lules que es troben replicant els seus genomes, per tant en fase S. Un cop els cultius foren tractats amb factor α (figura 28B) s'aprecia com el contingut de DNA de les dues poblacions es distribueix seguint un únic pic que coincideix amb el d'un contingut haploide, confirmant la correcta sincronització dels cultius a fase G1.

1.2.2 Alliberament dels cultius sincrònics en condicions d'estrès replicatiu

Els cultius sincrònics en fase G1 foren alliberats a fase S en condicions generadores d'estrès replicatiu per efecte de la HU. En aquestes condicions la soca salvatge activa la resposta *checkpoint* de fase S, mentre que la soca mutant *mec1Δ* no ho fa per la manca del transductor central de la via.

Per tal de confirmar la situació de crisi replicativa generada per la HU en totes dues soques, es va analitzar mitjançant FACS el contingut de DNA dels cultius una hora després de ser alliberades de final de la fase G1 (figura 28C).

En els perfils de FACS s'observa que el DNA de les cèl·lules de tots dos cultius continua distribuïnt-se al voltant del pic d'un contingut haploide de DNA (1C), mentre que en aquest període, en absència de HU, la replicació estaria pràcticament concloua (el pic 2C no s'observa). Interessantment, si comparem aquest pic amb de la població sincronitzada veiem que s'eixampla cap a la dreta, indicant que les cèl·lules han iniciat la replicació fins que han exhaurit el reservori existent de dNTP.

La manca en la progressió de la replicació podria ser deguda també a un alliberament defectuós de G1. Per tal de descartar aquesta possibilitat es van mesurar els índexs de gemmació dels cultius després d'alliberar-los una hora després del bloqueig a final de G1 (figura 29A).

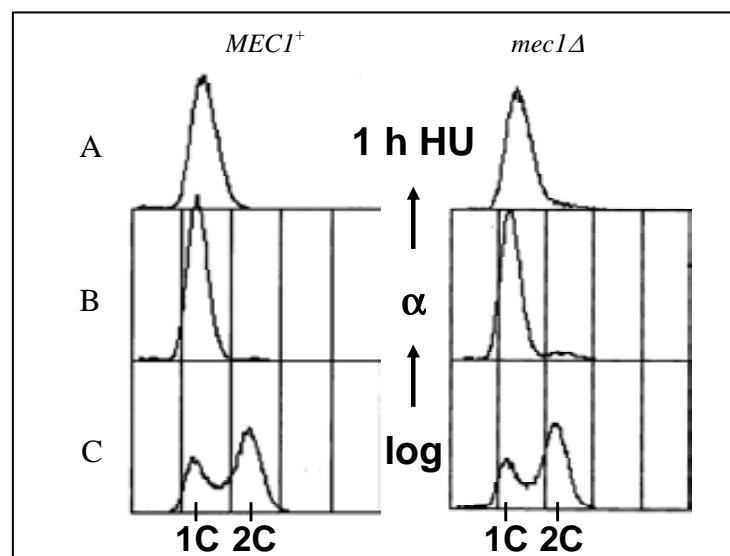


Figura 28. Anàlisi del contingut de DNA per FACS de les soques *MEC1⁺* i *mec1Δ*. (A) Perfils corresponents a creixement exponencial (log), (B) cultius sincronitzats a fase G1 (α) i (C) cultius alliberats en presència d'HU. 1C, indica un contingut haploide de DNA i 2C, contingut diploide.

RESULTATS

Les cèl·lules de *S. cerevisiae* en entrar en fase S desenvolupen petites gemmes (figura 9). Es va considerar un bon alliberament quan l'índex de gemmació era superior al 50%. Com es pot observar, en tots els casos com a mínim la meitat de les cèl·lules dels cultius estaven en fase S.

En la figura 29B, es representen les mitjanes de les dues soques en els quatre experiments independents realitzats. Com ja s'havia vist prèviament, la soca *mec1Δ* presenta cert retard en el cicle cel·lular, tot i això, la diferència amb la salvatge no és significativa, indicant així, que els cultius de les dues soques són comparables.

L'activació del *checkpoint* de fase S va ser confirmada analitzant l'estat de Rad53p mitjançant WB. Rad53p és la quinasa efectora del *checkpoint* de fase S que s'activa per hiperfosforilació dependent de la quinasa Mec1p. En el WB (figura 30) s'observa que en la soca salvatge en presència d'HU, Rad53p pateix un endarreriment en la seva mobilitat electroforètica, indicant de la seva hiperfosforilació activadora. Per contra, la soca *mec1Δ* va ser incapaç de fosforilar la proteïna en les mateixes condicions, confirmant la manca de resposta del mecanisme de manteniment de la integritat genòmica.

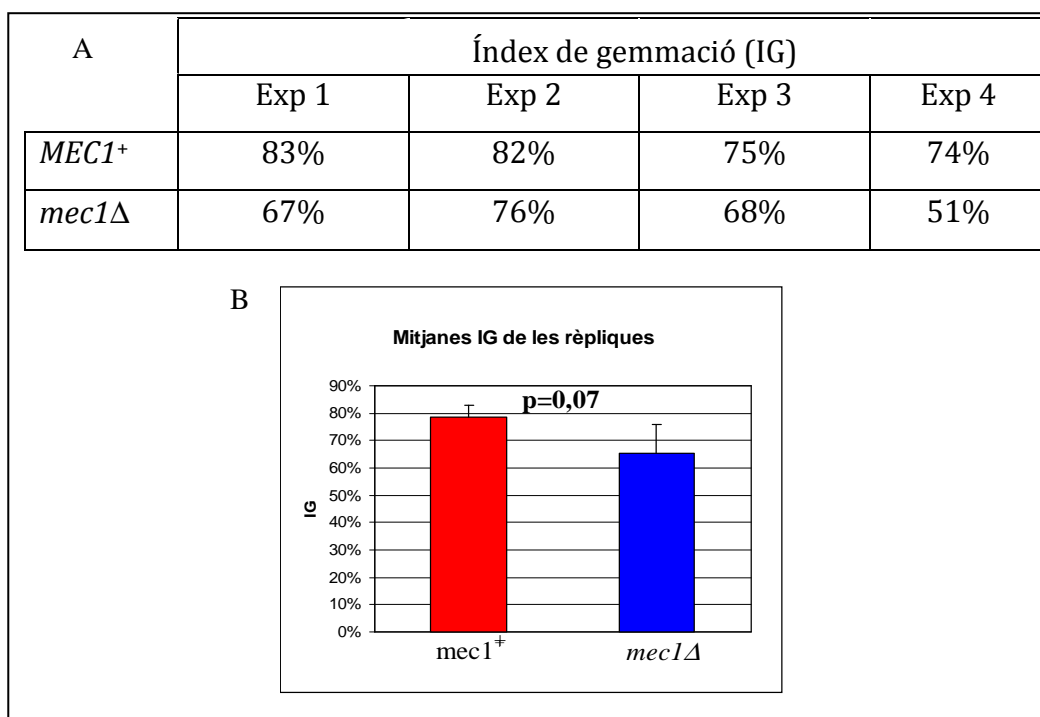


Figura 29. Índex de gemmació dels cultius alliberats en fase S pertorbada. (A) Valors dels IG de les quatre parelles experimentals. (B) Representació de la mitja dels IG dels quatre experiments independents de cada soca.

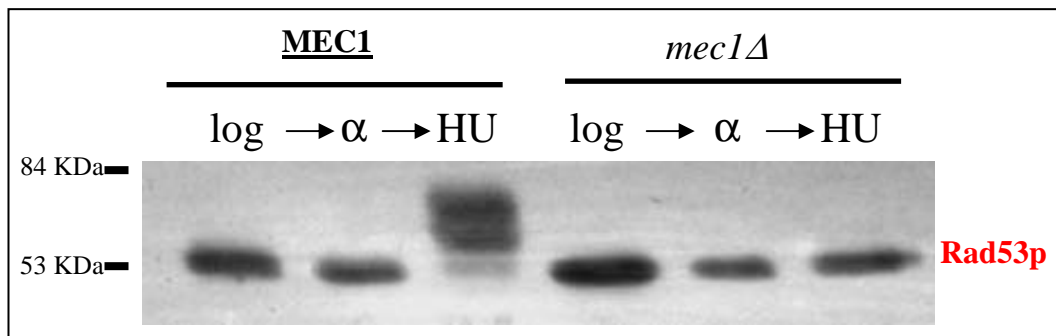


Figura 30. WB contra Rad53p d'una de les 4 parelles experimentals. log, cultius en creixement exponencial; α , cultius sincrònics i HU, cultius alliberats sincrònicament en presència d'HU.

1. 3 Anàlisi 2D-DIGE

Un cop es confirmà la bona sincronització cel·lular i l'activació del checkpoint de fase S de les quatre rèpliques independents, es procedí a comparar els proteomes de les dues soques a través del 2D-DIGE.

Cada parella experimental va ser marcada amb fluorocroms diferents (veure Materials i Mètodes 1.15.3). Barrejant la mateixa quantitat de proteïna de cadascuna de les vuit mostres es va fer l'estàndard intern que seguidament fou marcat amb el fluorocrom Cy2.

En cada gel bidimensional es carregà una barreja formada per les mateixes quantitats de la mostra corresponent a la soca salvatge, la mostra de la soca *mec1Δ* i del control intern.

Les proteïnes es varen separar per enfocament isoelèctric en la primera dimensió (veure Materials i Mètodes 1.15.4) i per pes molecular en la segona (veure Materials i Mètodes 1.15.5).

S'obtingueren les imatges de fluorescència de cadascun dels quatre gels bidimensionals. Per fer-ho es llegí cada gel en tres canals, el corresponent a fluorescència 670 nm (Cy5), el de fluorescència 580 nm (Cy3) i finalment el corresponent a la fluorescència 520 nm (Cy2), d'aquesta manera es visualitzà el proteoma de les soques *MEC1*⁺ (figura 31 imatge vermella) i *mec1Δ* (figura 31 imatge verda), així com del control intern (figura 31 imatge blava) en un únic gel.

La figura 31 mostra com a exemple la imatge de les lectures d'emissió d'una de les 4 rèpliques dels gels bidimensionals que es realitzaren.

Per quantificar les diferències de fluorescència s'utilitzà el programa d'anàlisi DeCyder. Amb el que es mesurà la fluorescència relativa vermella o verda en cada punt, estandaritzant-la respecte el control intern (fluorescència blava).

El programa comparà la repetitivitat dels resultats obtinguts en cada punt a cadascun dels quatre gels bidimensionals. El programa assigna números als punts

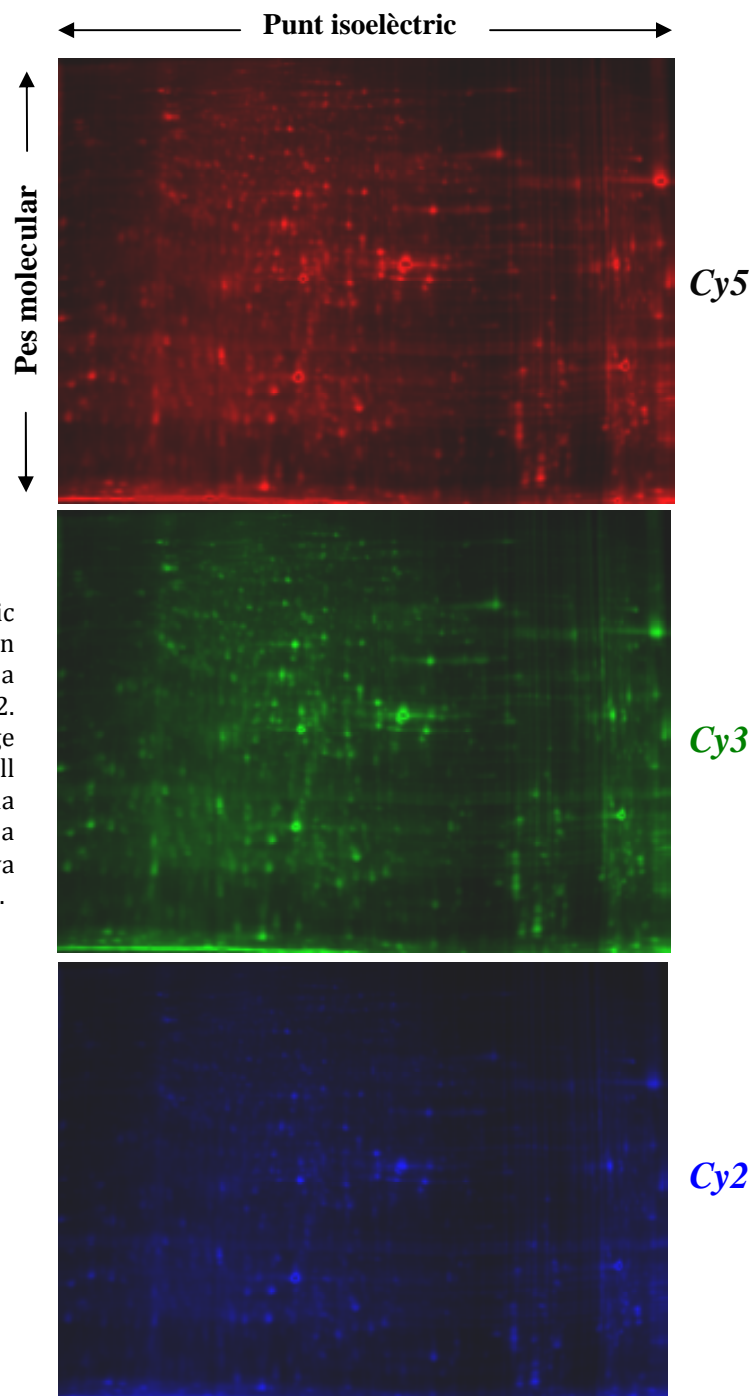


Figura 31. Mostra un únic gel bidimensional llegit en els 3 canals corresponents a l'excitació de Cy3, Cy5 i Cy2. En aquest cas, la imatge llegida en vermell correspon al proteoma de la soca *MEC1⁺* i la verda a *mec1Δ*. La imatge blava correspon al control intern.

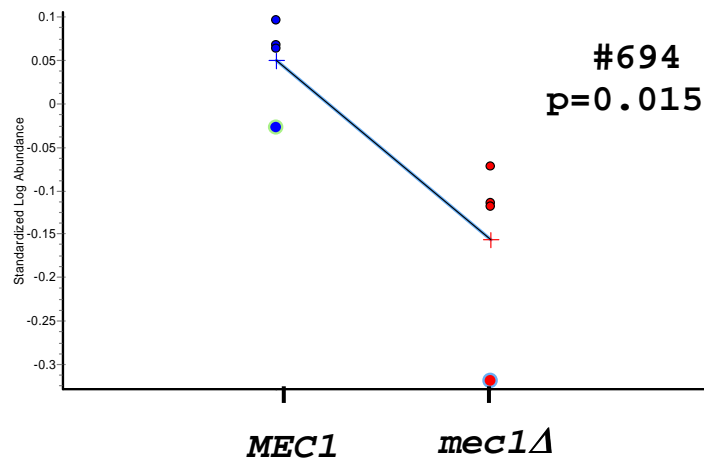


Figura 32. Exemple de la variació de fluorescència en un dels punts estadísticament significatius, concretament el número 694. Els quatre punts blaus corresponen a la fluorescència relativa de cadascuna de les rèpliques per la soca *MEC1*⁺, mentre que els quatre punts vermells fan referència a les rèpliques de la soca *mec1Δ*.

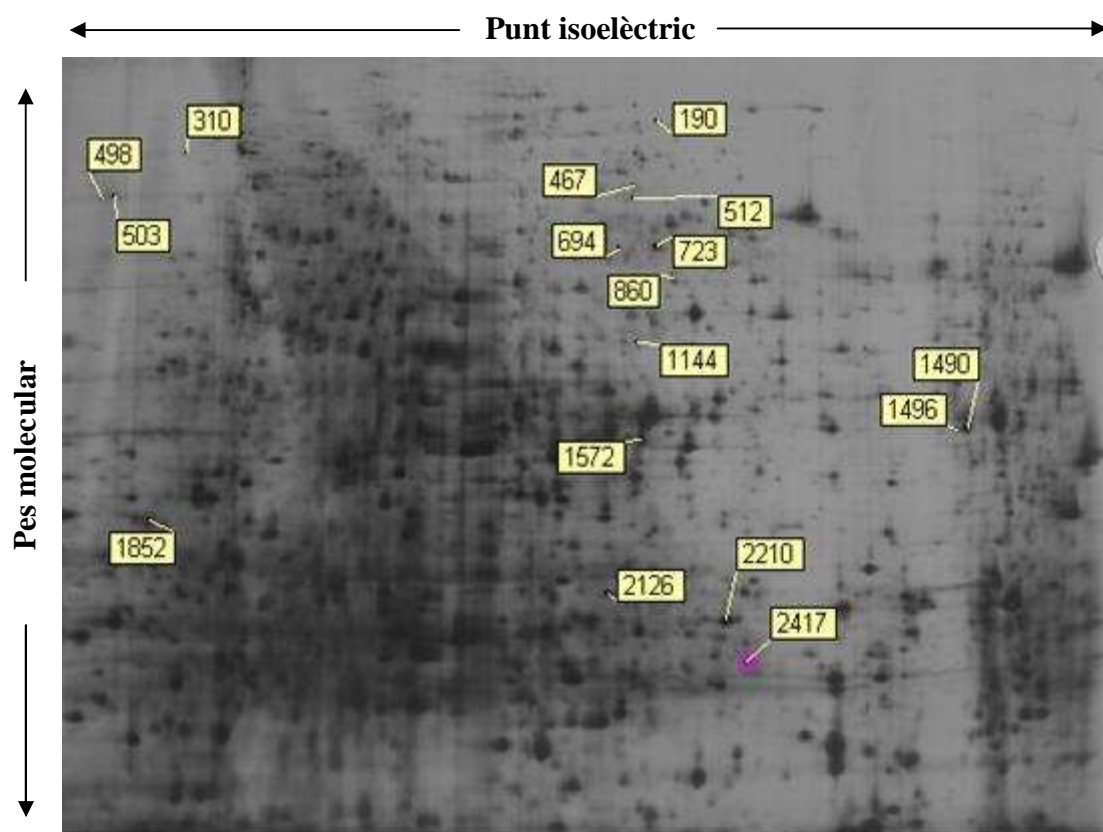


Figura 33. Un dels quatre gels bidimensionals tenyit amb nitrat de plata. Els punts marcats mostren la posició dels punts diferencials estadísticament significatius entre els proteomes de les dues soques, *MEC1*⁺ i *mec1Δ*.

que troba en el gel, facilitant així la comparació de cadascun d'ells entre les rèpliques. A la figura 32, es mostra la comparació del punt diferencial número 694 en les quatre rèpliques. S'observa com la fluorescència relativa és superior en les rèpliques corresponent a la soca salvatge respecte la soca deficient pel *checkpoint* de fase S.

Utilitzant el mateix programa es determinaren els punts diferencials estadísticament significatius, aplicant un test t d'*student* amb un nivell de significació mínim del 85%. Amb aquest interval de confiança s'identificaren 19 punts diferencials estadísticament significatius, mostrats a la figura 33, s'observa un dels gels bidimensionals tenyit amb nitrat de plata on s'aprecien els punts diferencials entre els proteomes de les dues soques.

1.4 Identificació de proteïnes per espectroscopia de masses

Es procedí a la identificació de la proteïna present en cadascun dels punts d'interès, mitjançant digestió trípica i anàlisi per espectrometria de masses (veure Materials i Mètodes 1.16).

El patró dels pèptids trípics obtinguts per cada punt analitzat, es va contrastar amb el patró esperat per a cadascuna de les proteïnes de *S. cerevisiae* utilitzant l'algoritme MASCOT. Aquest algoritme és un sistema de puntuació que es basa en el càlcul de la probabilitat de què l'aparellament entre les dades experimentals i la seqüència de cada proteïna present a la base de dades sigui a l'atzar. Per tant, l'aparellament amb menor probabilitat serà considerat com el millor. Això va permetre la identificació de la proteïna més probable present en cadascun dels punts. A la taula 6 es mostren els resultats obtinguts.

Les tres columnes de l'esquerra (fons groc) mostren paràmetres corresponents a l'anàlisi de la tècnica 2D-DIGE. La primera (núm. màster), indica la posició en el gel de cada punt. La segona (Test t), mostra l'interval de confiança obtingut en cada punt a partir d'un test t d'*student*. S'aplicà un nivell de significació del 85%. La tercera (Ratio), indica el valor de la diferència de la fluorescència entre les dues soques. A la part central de la taula (fons blanc) s'indiquen les proteïnes que van ser identificades. Les columnes de la dreta (fons blau) mostren paràmetres que fan referència a la identificació de les proteïnes mitjançant espectroscòpia de masses. Així doncs, "pI obs" indica el punt isoelèctric observat de la proteïna identificada.

Núm. màster	Test t	Ratio	Identificació	pI obs	PM obs	Score	Pept. assignats	% seqüència	% Intensitat
190	0,095	-1,43	Scp160p	5,64	134955	42	5	5,1	63,3
310	0,19	-1,36	Sec3	5,49	139017	84	12	16,7	57,7
369	0,033	-1,64	No identificada						
467	0,17	-1,23	Smc2p	6,83	133845	51	14	24,3	48,1
498	0,13	-1,38	No identificada						
503	0,16	-1,27	No identificada						
512	0,074	-1,24	No identificada						
694	0,015	-1,58	Lactat deshidrogenasa	6,41	55532	60	8	24	31,4
723	0,066	-1,46	Dihidrolipoamida deshidrogenasa	8,07	54261	92	11	30,5	72,9
860	0,11	-1,25	Glutatió disulfat reductasa	7,67	53693	181	21	51,2	82,8
1144	0,068	-1,31	Glucoquinasa	5,8	55741	79	7	21,4	58,5
1490	0,017	-1,5	Mg aldehyd deshidrogenasa	5,31	54648	128	142	29,5	61,8
1490	0,017	-1,5	G3P deshidrogenasa	8,29	35842		3	23,5	6,9
1496	0,046	-1,6	G3P deshidrogenasa	8,29	35842	35	10	12,7	26,9
1572	0,013	-1,36	Enolasa 1	6,17	46699	75		22,7	71,4
1852	0,12	1,23	No identificada				7		
2126	0,014	1,43	40S	8,62	24949	68	17	32,6	51
2210	0,021	1,24	Enolasa 2	5,67	46812	93		29,1	71,9
2417	0,1	1,78	No identificada						

Taula 6. Identificació per espectrometria de masses de les proteïnes en els punts diferencials estadísticament significatius obtinguts mitjançant 2D-DIGE. pI obs, punt isoelèctric observat; PM obs, pes molecular observat.

“PM obs”, és el pes molecular observat. *Score* és un paràmetre estimatiu de la fiabilitat de la identificació per MASCOT, on un *Score* superior a 52 indica una confiança d'identificació superior al 95%. “Pept. assignats”, és el número de pèptids tríptics generats a cada punt que corresponen a la proteïna identificada. “% seqüència”, indica quanta seqüència de la proteïna és reconeguda pels pèptids tríptics generats. Per últim, “% intensitat” indica el percentatge de senyal peptídic extret del punt que es correspon amb a la proteïna identificada.

En els punts on no s'aconseguí una bona identificació de la proteïna per MS/MALDI-TOF, els pèptids tríptics es van analitzar a través de dades de seqüència d'espectres MS/MS obtinguts per espectrometria ESI-Trampa iònica (veure Materials i Mètodes 1.16). Aquesta tècnica permet seleccionar pèptids tríptics concrets i fragmentar-los per obtenint així la informació ordenada de la seva seqüència.

Un cop identificades les proteïnes responsables dels canvis de fluorescència entre les dues soques en resposta a condicions d'estrès replicatiu, es procedí a l'estudi de la confirmació individual dels candidats d'interès com a dianes del mecanisme de vigilància de la integritat genòmica.

Cal destacar que no s'han identificat proteïnes que prèviament s'hagin relacionat amb la resposta del *checkpoint* de fase S. En els resultats es pot observar que destaquen proteïnes involucrades en el metabolisme del sucre (G3P deshidrogenasa, Lactat deshidrogenasa, glucoquinasa, enolases 1 i 2, Mg aldehyd deshidrogenasa, Dihidrolipoamida deshidrogenasa), una proteïna ribosomal (40 S), una proteïna implica en el transport cel·lular (Sec3p), una proteïna de la família de les vigilines, implicada en el processament dels RNA (Scp160p) i una proteïna que forma el nucli del complex condensina (Smc2p).

També s'ha de destacar que no s'aconseguí identificar cap proteïna en 6 dels punts estadísticament significatius identificats en el 2D-DIGE, això vol dir que els pèptids tríptics generats en aquests punts no es pogueren assignar a cap proteïna present en les bases de dades amb una elevada fiabilitat.

1.5 Estudi dels candidats d'interès

Com el nostre objectiu es centra en trobar candidats implicats en el control del cicle cel·lular es van seleccionar per estudis individuals les proteïnes: Smc2p, que forma part del complex encarregat de la condensació dels cromosomes en fase M, i Scp160p, proteïna que participa en el metabolisme dels mRNA, i que s'ha suggerit la seva implicació en la replicació i segregació dels cromosomes (Wintersberger et al., 1995).

1.5.1 Smc2p (*Structural Maintenance of Chromosomes 2*)

La condensació dels cromosomes replicats és imprescindible perquè la informació genètica sigui segregada correctament a les cèl·lules filles, per tant, aquest fenomen és crucial perquè es mantingui la integritat genòmica durant els processos de divisió cel·lular, tant a la mitosi com a la meiosi. Smc2p, és una proteïna essencial, que juntament amb Smc4p formen el component central del complex condensina. Un dels defectes que es produeixen quan el *checkpoint* de fase S és incapaç de respondre davant condicions d'estrès replicatiu és la condensació prematura dels cromosomes parcialment replicats (Nghiem et al., 2001), conduint a la mort cel·lular o generant inestabilitat genòmica. Smc2p és una bona candidata a ser diana de la resposta del *checkpoint* de fase S per evitar la progressió al llarg del cicle cel·lular en condicions d'estrès replicatiu inhibint la condensació inadequada de cromosomes parcialment replicats i ajudant activament a l'aturada en fase S.

En la identificació per espectroscòpia de masses Smc2p obté un *Score* de 51 (taula 6), al llindar de la fiabilitat, ja que l'*Score* 52 indica una $p < 0,05$. Això es degut en bona part a què el "% d'intensitat" és del 48%, és a dir, que els pèptids assignables a Smc2p justifiquen només la meitat del material proteic present en el punt (l'altra meitat no es va poder assignar) i com a conseqüència, aquesta incertesa es reflexa en el *Score*.

En canvi, els 14 pèptids obtinguts en aquest punt compatibles amb Smc2p cobreixen significativament el 24,3% de la seqüència d'aquesta proteïna (figura 34). Per tant es decidí la validació individual de Smc2p com a diana del *checkpoint* de fase S.

1	MKVEELIIDG	FKSYATR TVI	TDWDPQFNAI	TGLNGSGKSN	ILDAICFVLG
51	IASMSTV RAS	SLQDLIYKRG	QAGVTKASVT	IVFDNTDKSN	SPIGFTNSPQ
101	ISVTRQVVLG	GTSKYLINGH	RAPQQSVLQL	FQSVQLNINN	PNFLIMQGKI
151	TKVLNMKPSE	ILSLIEEAG	TKMFEDRREK	AERTMSKKET	KLQENRTLLT
201	EETEPKLEKL	RNEKRMFLEF	QSTQTDLEK T	ERIVVSVEYY	NIKHKHTSIR
251	ETLENGETR M	KMLNEFVKKT	SEEIDSLNED	VEEIKLQKEK	ELHREGTISK
301	LENK ENGLLN	EISRLKTSLS	IKVENLNDTT	EKSKALESEI	ASSSAKLIEK
351	KSAYANTEKD	YKMWQEQLSK	QRDLYKRKEE	LVSTLTGTS	STGAADGCYN
401	AQLAKAKTEL	NEVSLAIKKS	SMKMELLIKKE	LLTIEPKLKE	ATKDNELVK
451	HVKQCOETCD	KLPARLVEYG	FDFSRIDKDK	QREDKLSHY	YQTCCKNSEYL
501	KRRVTNLEFN	YTKPYPNFEA	§FVHG V VGQL	FQIDNDNIRY	ATALQTCAGG
551	RLFNVVQDS	QTATQLLERG	RLRKRVTIIP	LDKIYTRPIS	SQVLDLAKKI
601	APCKVELAIN	LIRFDESITE	AMEFIFGNL	ICEDPETAKK	ITFHPKIRAR
651	SITLQGDVYD	PEGTLSGGSR	NTSESLVDI	QKYNQIQKQI	ETIQADLNHV
701	TEELQTYAT	SQKTKTIQSD	LNL SL HLKLDL	AKRNLDANPS	SQIARNEEI
751	LRDIGECENE	IKTKQMSLKK	CQEEVSTIEK	DMKEYDSDKG	SKLNELKKEL
801	KLLAKELEEQ	ESESERKYDL	FQNL E LETEQ	LSSELD S NKT	LLHNHLKSIE
851	SLKLENSDLE	GKIR GVEDDL	VTVQTELNEE	KKRLMDIDDE	LNELETLIKK
901	KQDEKKSSEL	ELQKLVHDLN	KYKSNTN N ME	KIIEDLRQKH	EFLEDFDLVR
951	NIVK QNECID	LDTYRERSKQ	LNEKFQELRK	KVNPINMMI	ENVEKKEAAL
1001	KTMIKTIEKD	KMKIQETISK	LNEYKRETLV	KTWEKVTLDF	GNI F ADLLPN
1051	§FAK LVPCEG	KDVTQGLEVK	VKLGNIWKE§	LIELSGGQRS	LIALSLIMAL
1101	LQFRFAPMYI	LDEVDAALDL	SHTQNI G HLI	KTRFKGSQFI	VVSLK EGMFA
1151	NANRVFTRF	QDGT S VVSIM			

Figura 34. Seqüència aminoacídica de Smc2p en el llevat de gemmació. En vermell es mostren els pèptids tríptics identificats en el punt número 467 sobre la seqüència de Smc2p.

1.5.1.1 Obtenció de les soques Smc2-3xHA

Degut a la manca d'anticossos comercials contra Smc2p de llevat de gemmació, es van haver de construir dues noves soques a partir de les *MEC1+* i *mec1Δ* inicials, en les que es substituï el gen *SMC2* endogen per un *SMC2* etiquetat (veure Materials i Mètodes 1.4.2). Per obtenir les soques s'utilitzà una construcció cedida pel Dr. A. V. Strunnikov que presentava el gen de *SMC2* amb una etiqueta intersticial formada per 3 repeticions d'hematoglutina (3xHA) seguit del marcador auxotròfic *LEU2*. El vector es va tallar amb els enzims de restricció Xba I i Sal I per alliberar el fragment *SMC2-3xHA* i *LEU2* de 6 Kb (figura 35). Aquest s'utilitzà per transformar establenent les soques *MEC1+* i *mec1Δ* de llevat (veure Materials i Mètodes 1.5).

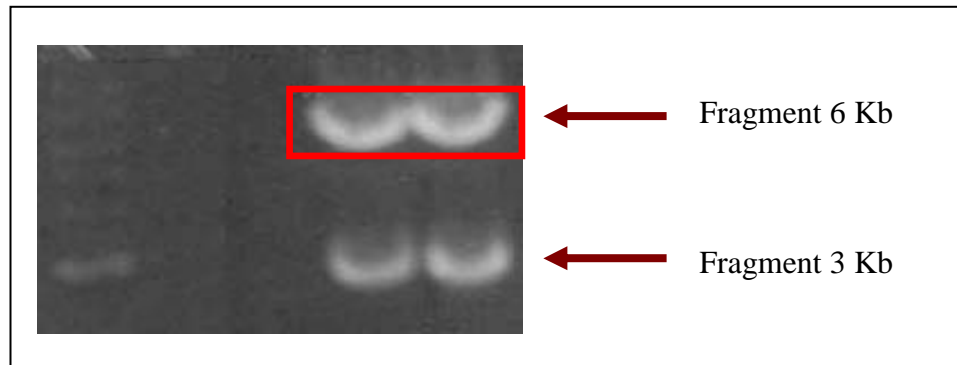


Figura 35. Comprovació de la digestió del vector cedit pel Dr. A. V. Strunnikov amb Xba I i Sal I. El fragment de 6 Kb va ser retallat del gel, purificat i utilitzat per transformar les soques de llevat *MEC1⁺* i *mec1Δ*.

Es van aïllar 7 clons de la soca *MEC1⁺* i 5 de la soca *mec1Δ* capaços de créixer en medi mínim sense leucina. Aquests van ser confirmats per la presència de SMC2-3xHA per tècniques de WB contra l'etiqueta HA (figura 36). La banda específica corresponen a la detecció de l'etiqueta HA, era de 130 KDa, compatible amb el pes molecular de Smc2p.

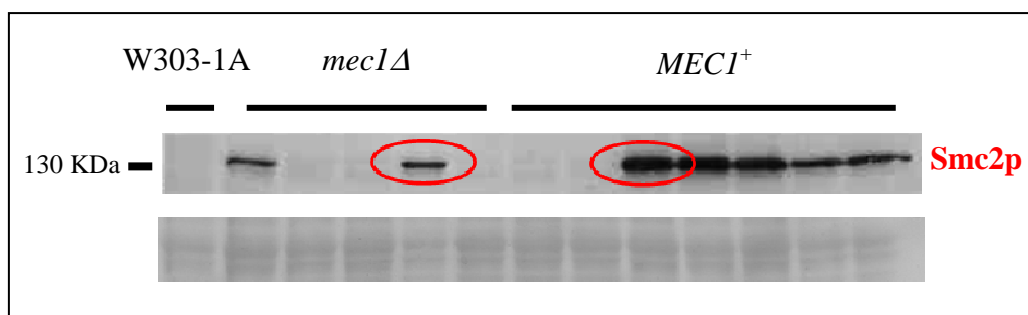


Figura 36. En el panell superior WB anti-HA (3F10) dels clons positius per Smc2-3xHA de les soques transformades *MEC1⁺* i *mec1Δ*. En vermell s'indiquen els clons seleccionats per l'estudi. En el panell inferior control de càrrega a partir d'una banda tenyida amb Ponceau S.

Dels 7 clons aïllats per la soca *MEC1⁺* 5 presentaven la proteïna recombinant Smc2-3xHA i només 2 dels 5 clons de la soca deficient pel mecanisme del manteniment de la integritat genòmica foren positius. Els clons marcats en vermell en la figura 36 s'utilitzaren per estudiar Smc2p com a diana del *checkpoint* de fase S.

1.5.1.2 Comprovació de Smc2p com a diana del *checkpoint*

Les soques *Mec1⁺ SMC2-3xHA*, *mec1Δ SMC2-3xHA* i una parental, W303-1A, es van créixer en medi ric YPD, es sincronitzaren a final de la fase G1 amb la feromona factor α (veure Materials i Mètodes 1.8) i finalment s'alliberaren sincrònicament en fase S en presència d'HU (veure Materials i Mètodes 1.9).

Per determinar el grau de sincronització a final de fase G1 es va mesurar l'índex de gemmació (veure Materials i Mètodes 1.7), en tots els casos era inferior al 5%, és a dir, almenys el 95% de les cèl·lules dels cultius estaven en fase G1.

Per confirmar que les cèl·lules havien reprès el cicle un cop alliberades del bloqueig en condicions d'estrès replicatiu per l'efecte de la HU, es va tornar a mesurar l'índex de gemmació, en tots els casos va ser superior al 70%.

Per comprovar si Smc2p pateix canvis dependents de l'activació del *checkpoint* de fase S es procedí a fer un WB anti-HA amb l'anticòs 3F10.

Si el mecanisme de supervivència acumula o destrueix Smc2p en el WB s'espera veure canvis en la intensitat de la senyal entre les dues soques, per contra si introdueix canvis post-traduccionals s'espera un canvi de mobilitat de la banda específica.

Com es pot observar a la figura 37A en el resultat de WB no s'aprecia cap canvi en Smc2p dependent del *checkpoint* de fase S. La banda observada al WB és específicament Smc2-3xHA, ja que no apareix a la soca parental. En la figura 37B veiem que el mecanisme de supervivència s'ha activat correctament, ja que tant la soca parental, W303-1A, com la soca *mec1⁺* presenten la forma hiperfosforilada de Rad53p, mentre que la soca *mec1Δ* no, per causa de la deficiència del transductor central Mec1p.

Com els transductors centrals del mecanisme de manteniment de la integritat genòmica, Mec1p i Rad53p, són proteïnes quinasa, el següent pas va ser estudiar específicament si el nostre candidat, Smc2p, podia estar fosforilat d'una manera dependent del *checkpoint* de fase S.

Primer es va analitzar la seqüència de la proteïna amb l'aplicació NetPhosYeast 1.0 del paquet informàtic cbs *Prediction Service* per avaluar la presència de serines o treonines putativament fosforilables. Aquesta aplicació compara la informació de la seqüència amb les fosforilacions de proteïnes descrites. Paral·lelament es va estudiar la presència de dominis fosforilables de Mec1p (SQ/TQ) i de l'efector quinasa Rad53p, que tot i que no té una

seqüència consens de fosforilació, si que presenta seqüències per les que té afinitat (I/L/V/M)(-)(S/Q)(-)(I//V/M) (Sidorova and Breeden, 2003) (figura 38).

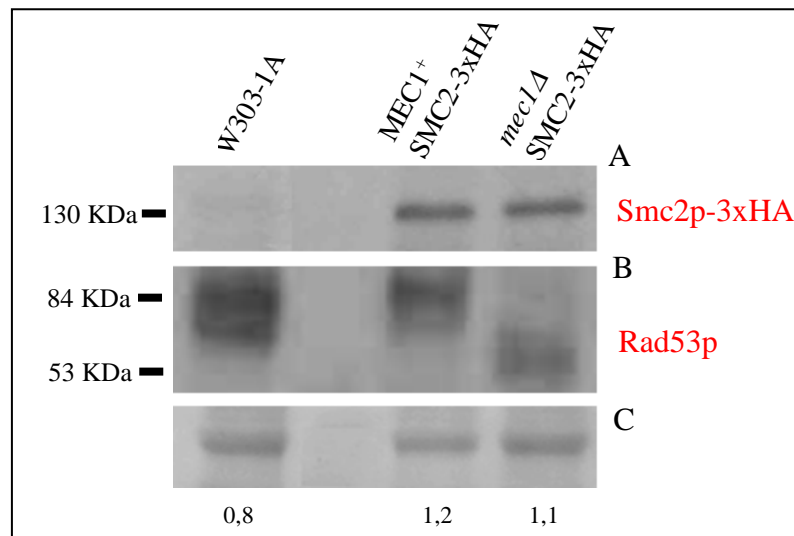


Figura 37. Estudi de Smc2p com a diana del *checkpoint*. (A) WB anti-HA (3F10). (B) WB anti-Rad53. (C) Es mostra una banda de la tinció amb Ponceau S com a control de càrrega. Es mostren els quocients entre la banda de Smc2p i el control de càrrega calculats amb el programa GeneTools (SynGene).

El programa informàtic va trobar 20 residus putativament fosforilables, dos dels quals coincideixen amb regions per les que té afinitat Rad53p, una d'elles alhora coincidint amb una regió fosforilable per Mec1p, tot i això, no es pot descartar que altres serines o treonines puguin ser també fosforilades per Rad53p, ja que presenta una elevada permissivitat per la seva seqüència diana.

Per fer l'estudi, es va realitzar una immunoprecipitació en extractes proteics totals de la proteïna recombinant Smc2-3xHA utilitzant l'anticòs anti-HA (3F10) (veure Materials i Mètodes 1.13), seguit d'un WB dirigit contra residus fosforilats tirosina, treonina i serina (Abcam). Els resultats es recullen a la figura 39.

No s'observà cap banda en el WB anti-residus fosforilats. D'aquesta manera podem concloure que no hem aconseguit demostrar que Smc2p es fosforili de forma dependent del *checkpoint* de fase S. Per estar segurs que la immunoprecipitació anti-HA s'havia realitzat correctament, es va fer un WB anti-HA (3F10) en la mateixa membrana (figura 39B).

S'aprecia que la banda de Smc2-3xHA (130 KDa) és present en els clons de les soques recombinants per la proteïna (*MEC1+* i *mec1Δ*). Com era d'esperar la banda no apareix en les mostres de la soca parental.

Amb aquests dos resultats no podem confirmar que Smc2p sigui diana del *checkpoint* de fase S. Tot i que s'han de realitzar experiments més específics per estudiar si la proteïna pot patir modificacions post-traduccionals dependents del *checkpoint* de fase S.

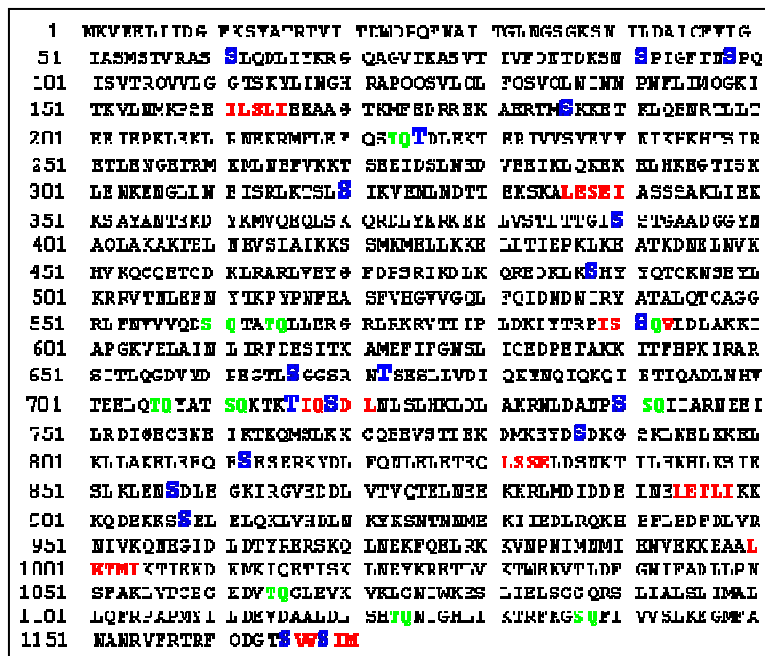


Figura 38. Regions putativament fosforilables en la seqüència de Smc2p. Marcat en verd els dominis fosforilables pel transductor central Mec1p, en vermell regions d'afinitat de l'efector central Rad53p i en blau les serines i treonines que el programa NetPhosYeast 1.0 va predir com a fosforilables.

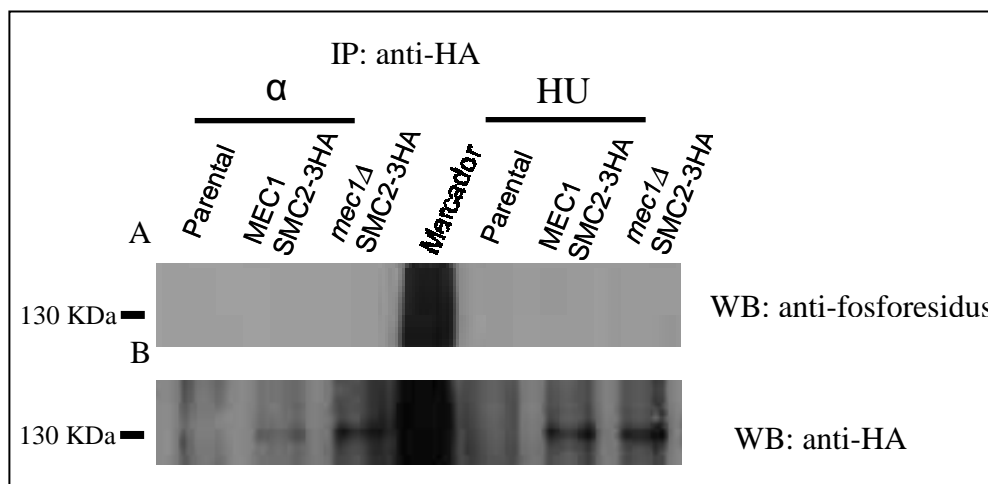


Figura 39. Es va realitzar una immunoprecipitació amb l'anticòs anti-HA. (A) WB anti-residus fosforilats inespecífics. (B) WB anti-HA (3F10). α, cultius sincronitzats en fase G1 i HU, cultius alliberats en condicions d'estrès replicatiu.

1.5.2 Scp160p

Scp160p, és un altre candidat interessant des del punt de vista del control del cicle cel·lular. Malgrat que el seu mecanisme d'acció és encara desconegut, és possible que es trobi implicat en la replicació o en la segregació de cromosomes, ja que la deleció del gen dóna lloc a l'aparició de cèl·lules poliploides (Wintersberger *et al*, 1995).

En la identificació de Scp160p per espectrometria de masses obtingué un *Score* de 42, bastant per sota del valor 52 que dóna una fiabilitat en la identificació ($p \leq 0,05$). El baix *Score* es deu a què només el 5,1% de la seqüència de la proteïna es recoberta pels pèptids generats en aquest punt del gel bidimensional, com es mostra a la figura 40. En canvi, té un "% d'intensitat" de 63,3, és a dir, que gran quantitat dels pèptids generats en el punt s'assignaren a Scp160p.

1	MSEEQTAIDS	PPSTVEGSVE	TVITIDSPST	TASTIAATAE	EHPQLEKKPT
51	PLPSLKDLPS	LGSNAAFANV	KVSWGPNMKP	AVSNSPSPSP	SAPSLTTGLG
101	AKRMRSKNIQ	EAFITLDLQSQ	LSITKPELSR	IVQSVKKNHD	VSVESTLSKN
151	ARTFLVSGVA	ANVHEAKREL	VKKLTKPINA	VIEVPSKCKA	SIIGSGGRTI
201	REISDAYEVK	INVSKEVNEI	SYDEDMDDTT	SNVSLFGDFE	SVNLAKAKIL
251	AIVKEETKNA	TIKLVVEDEK	YLPYIDVSEF	ASDEGDDEEVK	VQFYKKSVDI
301	VILGPREKAK	ATKTSIQDYI	KKLASNLDEE	KVKIPSKFQF	LIDAEELKEK
351	YNVIVTFPST	PDELVSFVVG	LRDKVGEAIT	YARSSSKSYV	VESLDISKAH
401	SKNLTHAKNL	IMYFTKYSVL	KGLEESHNV	KISLPSIQSL	PTAETVTIHI
451	SAKSDEANDI	KAVRKELISF	VNNIPPSETL	VITDLDYELF	GGSIKHCLLA
501	SESSVAFVQF	GDYYPNDNSI	LLVALTEDED	FKPSIEEIQE	SLNKANESLN
551	SLRTKQNNME	TKTYEFSEEV	QDSLFPKSSA	TWKLIMEDIS	EQEGLHQIKL
601	HTPEENQLTV	RGDEKAAKAA	NKIFESILNS	PSSKSKMTVN	IPANSVARLI
651	GNKGSNLQOI	REKFACQIDI	PNEENNNASK	DKTVEVTLTG	LEYNLTHAKK
701	YLAEEAKKWA	DIITKELIVP	VKPHGSLIGP	HGTYRNRLQE	KYNVFINFPR
751	DNEIVTIRGP	SRGVNKAHEE	LKALLDFEME	NGHKMVINVP	AEHVPRIIIGK
801	NGDNINDIRA	EYGVEMDFLQ	KSTDPKAQET	GEVELEITGS	RQNIKDAAKR
851	VESIVAEASD	FVTEVLKIDH	KYHKSIVGSG	GHILREIISK	AGGEEIRNKS
901	VDIPNADSEN	KDITVQGPQK	FVKKVVEEIN	KIVKDAENSV	TKTIDIPAER
951	KGALIGPGGI	VRRQLESEFN	INLFVFNKDD	PSGKITITGA	PENVEKAEKK
1001	ILNEIIRENF	DREVDVPASI	YEYVSEKGF	IQLRMDLSV	NVRFNGTSSK
1051	ANKLARAPIE	IPLEKVCGST	EGENAETKTF	TIEEVGAPTS	SEEGDITMRL
1101	TYEPIDLSSI	LSDGEEKEVT	KDTSNDSAKK	EEALDTAVKL	IKERIAKAPS
1151	ATYAGYVWGA	DTRRFNMIVG	PGGSNIKKIR	EADAVIINVP	RKSDKVNDDV
1201	YIRGKAGVE	KAGEMVLKSL	RR		

Figura 40. Seqüència aminoacídica de Scp160p de *S. cerevisiae*. En vermell es mostren els pèptids tríptics identificats en el punt número 190 sobre la seqüència de Scp160p.

1.5.2.1 Comprovació de Scp160p com a diana del checkpoint

Es va estudiar si Scp160p patia canvis a nivell proteic de manera dependent del checkpoint de fase S, i per tant, confirmar si és una diana del mecanisme de supervivència com indicava l'anàlisi 2D-DIGE. Per abordar aquesta qüestió, com en el cas de Smc2p, es va fer a través de WB, utilitzant un anticòs específic contra la proteïna.

Prèviament, es va estudiar la presència de residus putativament fosforilables per les quinases del checkpoint de fase S, Mec1p i Rad53p, comparant-les amb els residus Ser/Thr putativament fosforilables generats pel programa informàtic NetPhosYeast 1.0. En aquest cas, el programa va predir la presència de 34 residus fosforilables, 4 d'ells coincideixen amb regions d'afinitat de la quinasa Rad53p (figura 41).

1	M	S	E	E	Q	T	A	I	D	S	P	P	S	T	V	E	G	S	V	E	T	V	T	T	I	D	S	P	S	T	T	A	S	T	I	A	A	T	A	E	E	H	P	Q	L	E	K	K	P	T	
51	P	L	P	S	L	K	D	L	P	S	L	G	S	N	A	A	F	A	N	V	K	S	W	G	P	N	M	K	P	A	V	S	N	S	P	S	P	S	P	S	A	P	S	L	T	G	L	T	G	L	G
101	A	K	R	M	R	S	K	N	I	Q	E	A	F	T	L	D	L	Q	S	Q	L	S	I	T	K	P	E	L	S	R	I	V	Q	S	V	K	K	N	H	D	V	S	V	E	S	T	L	S	K	N	
151	A	R	T	F	L	V	S	G	V	A	A	N	V	H	E	A	K	R	E	L	V	K	L	T	K	P	I	N	A	V	I	E	V	P	S	K	C	K	A	S	I	I	G	S	G	G	R	T	I		
201	R	E	I	S	D	A	Y	E	V	K	I	N	V	S	K	E	V	N	E	N	S	Y	D	E	M	D	D	T	S	N	V	S	L	F	G	D	F	E	S	V	N	L	A	K	A	K	I	L			
251	A	I	V	K	E	E	T	K	N	A	T	I	K	L	V	V	E	D	E	K	Y	L	P	I	D	V	S	E	F	A	S	D	E	G	D	E	E	V	K	V	Q	F	Y	K	K	S	G	D	I		
301	V	I	L	G	P	R	E	K	A	K	A	T	K	T	S	I	Q	D	Y	L	K	K	L	A	S	N	L	D	E	E	K	V	K	I	P	S	K	F	Q	F	L	I	D	A	E	E	L	K	E	K	
351	Y	N	V	I	V	T	F	P	S	T	P	D	D	E	L	V	S	F	V	G	L	R	D	K	V	G	E	A	I	T	Y	A	R	S	S	S	K	S	Y	V	V	E	S	L	D	I	S	K	A	H	
401	S	K	N	L	T	H	A	K	N	L	I	M	Y	F	T	K	Y	S	V	L	K	G	L	E	E	S	H	P	N	V	K	I	S	L	P	S	I	Q	S	L	P	T	A	E	T	V	T	I	H	I	
451	S	A	K	S	D	E	A	N	D	I	K	A	V	R	K	E	L	I	S	F	V	N	N	I	P	P	S	E	T	L	V	I	T	D	L	D	Y	E	L	F	G	G	S	I	K	H	C	L	L	A	
501	S	E	S	S	V	A	F	V	Q	F	G	D	Y	P	N	D	N	S	I	L	L	V	A	L	T	E	D	E	D	F	K	P	S	I	E	E	I	Q	A	S	L	N	K	A	N	E	S	L	N		
551	S	L	R	T	K	Q	N	N	M	E	T	K	T	Y	E	F	S	E	E	V	Q	D	S	L	F	K	P	S	S	A	T	W	K	L	I	M	E	D	I	S	E	Q	E	G	H	L	Q	I	K	L	
601	H	T	P	E	E	N	Q	L	T	V	R	G	D	E	K	A	A	K	A	A	N	K	I	F	E	S	I	L	N	S	P	S	S	K	S	K	M	T	V	N	I	P	A	N	S	V	A	R	L	I	
651	G	N	K	S	N	L	Q	Q	I	R	E	K	F	A	C	Q	I	D	I	P	N	E	E	N	N	N	A	S	K	D	K	T	V	E	V	T	L	T	G	L	E	Y	N	L	T	H	A	K	K		
701	Y	L	A	A	E	A	K	K	W	A	D	I	I	T	K	E	L	I	V	P	V	K	F	H	G	S	L	I	G	P	H	G	T	Y	R	N	R	L	Q	E	K	Y	N	V	F	I	N	F	P	R	
751	D	N	E	I	V	T	I	R	G	P	S	R	G	V	N	K	A	H	E	E	L	K	A	L	L	D	F	E	M	E	N	G	H	K	M	V	I	N	V	P	A	E	H	V	P	R	I	I	G	K	
801	N	G	D	N	I	N	D	I	R	A	E	Y	G	V	E	M	D	F	L	Q	K	S	T	D	P	K	A	Q	E	T	G	E	V	E	L	E	I	T	G	S	R	Q	N	I	K	D	A	A	K	R	
851	V	E	S	I	V	A	E	A	S	D	F	V	T	E	V	L	K	I	D	H	K	Y	H	K	S	I	V	G	S	G	H	I	L	R	E	I	I	S	K	A	G	G	E	E	I	R	N	K	S		
901	V	D	I	P	N	A	D	S	E	N	K	D	I	T	V	Q	G	P	Q	K	F	V	K	K	V	V	E	E	I	N	K	I	V	K	D	A	E	N	S	V	T	K	T	I	D	I	P	A	E	R	
951	K	G	A	L	I	G	P	G	G	I	V	R	R	Q	L	E	S	E	F	N	I	N	L	F	V	P	N	K	D	D	P	S	G	K	I	T	I	T	G	A	P	E	N	V	E	K	A	E	K	K	
1001	I	L	N	E	I	I	R	E	N	F	D	R	E	V	D	V	P	A	S	I	Y	E	Y	V	S	E	R	G	A	F	I	Q	K	L	R	M	D	L	S	V	N	V	R	F	G	N	T	S	K	K	
1051	A	N	K	L	A	R	A	P	I	E	I	P	L	E	K	V	C	G	S	T	E	G	E	N	A	E	K	T	K	F	T	I	E	E	V	G	A	P	T	S	S	E	E	G	D	I	T	M	R	L	
1101	T	Y	E	P	I	D	L	S	S	I	L	S	D	G	E	E	K	E	V	T	K	D	T	S	N	D	S	A	K	K	E	A	L	D	T	A	V	K	L	I	K	E	R	I	A	K	A	P	S		
1151	A	T	Y	A	G	Y	V	W	G	A	D	T	R	R	F	N	M	I	V	G	P	G	S	N	I	K	K	I	R	E	A	A	D	V	I	I	N	V	P	R	K	S	D	K	V	N	D	V	V		
1201	Y	I	R	G	T	K	A	G	V	E	K	A	G	E	M	V	L	K	S	L	R	R																													

Figura 41. Regions putativament fosforilables en la seqüència de Scp160p. Marcat en verd els dominis fosforilables pel transductor central Mec1p, en vermell regions d'afinitat de l'efector central Rad53p i en blau les serines i treonines putativament fosforilables de l'aplicació NetPhosYeast 1.0.

Les soques de *S. cerevisiae* *MEC1+* i *mec1Δ* es van créixer en medi ric. Els cultius foren sincronitzats a final de la fase G1 amb la feromona factor α (veure Materials i Mètodes 1.8) i alliberats de forma sincrònica en condicions d'estrès replicatiu induïts per la presència d'HU (Materials i Mètodes 1.9).

Per confirmar la sincronització en fase G1 i l'entrada en cicle després d'alliberar els cultius en presència d'HU es van mesurar els índex de gemmació (veure Materials i Mètodes 1.7).

Els cultius sincrònics en fase G1 en tots els casos presentaren índexs inferiors al 5%, mentre que els cultius alliberats en fase S mostraven valors superiors al 60%.

S'obtingueren les proteïnes totals dels cultius (Materials i Mètodes 1.11-TCA) i seguidament es va fer un WB anti-Scp160.

Com en el cas de Smc2p, esperàvem trobar canvis de quantitat de la banda corresponent a Scp160p (134 KDa) o canvis de mobilitat produïts per modificacions post-traduccionals dependents del *checkpoint* de fase S.

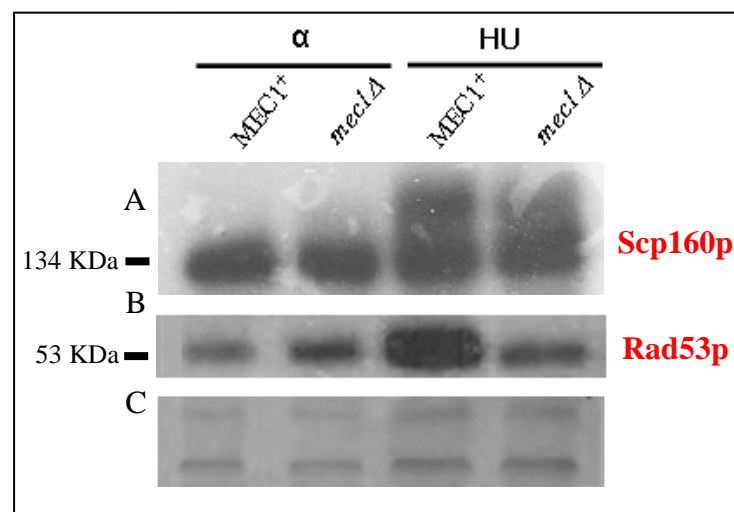


Figura 42. Estudi de Scp160p com a diana del *checkpoint*. (A) WB anti-Scp160. (B) WB anti-Rad53. (C) Imatge de la tinció amb Ponceau S de la membrana. α , cultius sincronitzats en fase G1, HU, cultius alliberats en presència d'estrès replicatiu.

Com s'observa a la figura 42 no es produeix cap canvi en Scp160p entre la soques salvatge i la deficient pel *checkpoint* de fase S en condicions d'estrès replicatiu. En canvi s'aprecia l'aparició d'una banda de pes molecular superior de la proteïna en totes dues mostres en condicions d'estrès replicatiu en relació a les mostres sincronitzades en fase G1. Aquest endarreriment en la mobilitat pot ser compatible amb una modificació post-traduccionals.

Com la banda apareix tant a la soques salvatge com a la defectiva en la resposta del *checkpoint* de fase S pot ser explicada perquè la proteïna pateixi canvis d'estat durant la fase S o per un efecte de la HU independent del mecanisme de supervivència, o fins i tot per l'activació de la quinasa transductora Tel1p que regula una via paral·lela del *checkpoint* de fase S (Nyberg et al., 2002).

Per estudiar si la diferència de quantitat de la proteïna és conseqüència de la fase del cicle en què es troben les cèl·lules, un cultiu de la soques parental W303-1A va ser sincronitzat a

final de la fase G1 amb factor α (IG=1,1%) i alliberat en una fase S no pertorbada. Es van prendre alíquotes cada 20 minuts des de l'alliberament durant 2 hores (temps en què el llevat completa un cicle a 24 °C).

Un cop s'obtingueren els extractes totals, es procedí a la realització del WB contra Scp160 (figura 43).

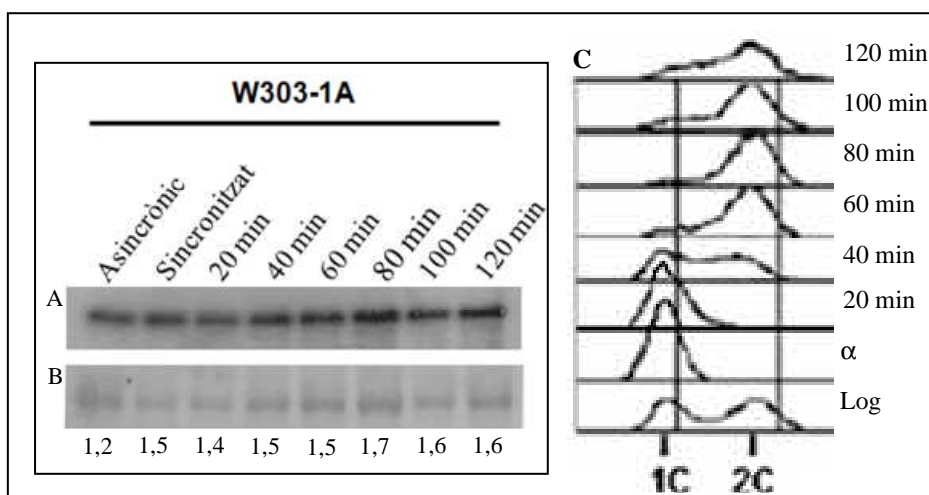


Figura 43. Comportament de Scp160p en un cicle no pertorbat. (A) WB anti-Scp160. (B) Tinció amb Ponceau S com a control de càrrega. Es mostren els quocients entre la banda de Scp160p i el control de càrrega calculats amb el programa GeneTools (SynGene). (C) Perfils de FACS al llarg del cicle cel·lular després de la sincronització amb factor α (α) i posterior alliberament. Log, perfil del cultiu en creixement exponencial. 1C, un contingut haploide de DNA, 2C, contingut diploide.

Com s'aprecia a la figura 43A no es produeix cap canvi en la mobilitat o de quantitat de Scp160p al llarg del cicle cel·lular. En la figura 43C s'observa la progressió dels cultius de llevats al llarg del cicle cel·lular des de l'alliberació de G1.

Per tant l'acumulació i l'estat de la proteïna no sofreixen canvis al llarg del cicle cel·lular.

Tot i això, encara quedava descartar que la diferència de l'endarreriment en la migració de Scp160p observada anteriorment en la figura 42A en condicions d'estrès replicatiu fos deguda a un efecte inespecífic de la HU, independent de l'activació de la quinasa Mec1p, ja que l'acumulació s'aprecia tant a la soca salvatge com a la defectiva. Per estudiar aquesta possibilitat es va monitoritzar l'estat de Scp160p en un cultiu de la soca parental, W303-1A, alliberat sincrònicament en fase S en presència d'HU, s'agafaren alíquotes cada 20 minuts des de l'alliberament durant dues hores.

Seguidament, es realitzà un WB contra Scp160p (figura 44). No es va poder observar cap variació de Scp160p per la presència d'HU. D'aquesta forma es confirmà que el canvi de mobilitat observat anteriorment era un artefacte o està relacionat amb la deleció de *SML1*, ja que només apareix en les soques que presenten el gen delecionat.

Per tant, amb aquests resultats no s'ha pogut confirmar que Scp160p sigui diana del *checkpoint* de fase S, tot i que encara s'hauran de fer experiments específics per estudiar possibles fosforilacions induïdes per l'activació *checkpoint* de fase S.

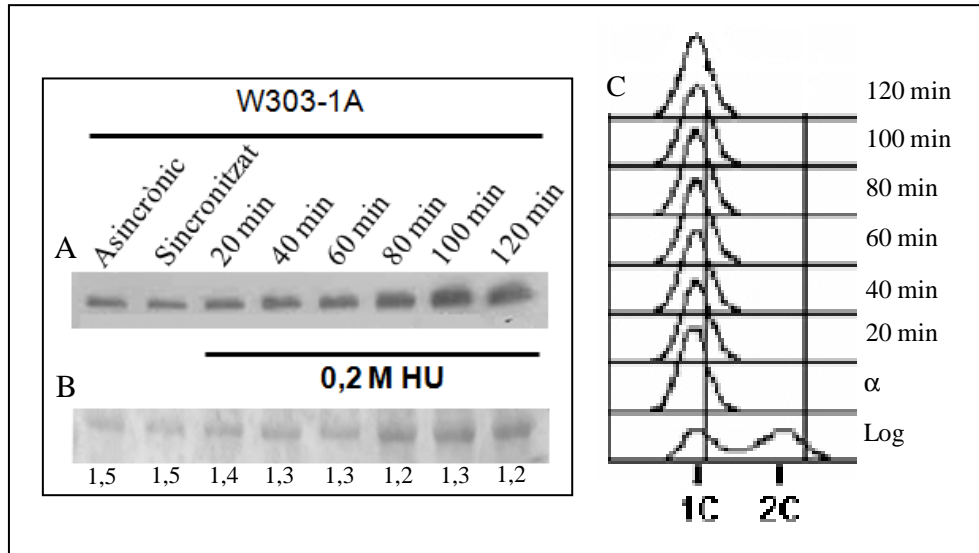


Figura 44. Comportament de Scp160p en una fase S pertorbada. (A) WB anti-Scp160. (B) Imatge del Ponceau S. Es mostren els quocients entre la banda de Scp160p i el control de càrrega calculats amb el programa GeneTools (SynGene). (C) Perfils de FACS al llarg de la fase S amb estrès replicatiu després del la sincronització amb factor α (α). Log, perfil del cultiu en creixement exponencial. 1C, un contingut haploide de DNA, 2C, contingut diploide.

**IDENTIFICACIÓ DE DIANES DEL *CHECKPOINT* DE FASE S
MITJANÇANT BIOLOGIA MOLECULAR: MICROXIPS D'EXPRESSIÓ**

Com no s'aconseguí confirmar les proteïnes candidates obtingudes al 2D-DIGE com a dianes del *checkpoint* de fase S, es va decidir adoptar una nova estratègia basada en l'estudi de l'expressió diferencial en cèl·lules humanes en condicions activadores o inhibidores de la via. Per realitzar-ho s'obtingueren microxips d'expressió en cèl·lules HeLa tractades amb HU (condicions activadores), HU i cafeïna (condicions inhibidores) o no tractades (control negatiu).

2.1 Tractament dels cultius de cèl·lules HeLa

En vertebrats superiors, el transductor central del *checkpoint* de fase S, ATR (ortòleg de Mec1p en el llevat de gemmació) és essencial, per tant, la seva deleció és letal. Per aquest motiu es va utilitzar la cafeïna per inhibir l'activitat d'aquesta quinasa (Beckerman et al., 2009; Sarkaria et al., 1999).

Com es va explicar anteriorment, el *checkpoint* de fase S en humans consta de dues rutes moleculars paral·leles, una d'elles regulada a través de la quinasa ATR i l'altra a través d'ATM. La cafeïna inhibeix totes dues quinases. Tot i això en el present estudi ens em basat en la via d'ATR, ja que la droga emprada per activar el mecanisme de vigilància de la integritat genòmica, la HU, genera estrès replicatiu al qual respon aquesta quinasa.

Per poder comparar els transcriptomes de les cèl·lules HeLa en condicions activadores o inhibidores del *checkpoint* de fase S, els cultius es van tractar durant 4h amb HU (per induir estrès replicatiu i activar el *checkpoint*), HU i cafeïna (induint estrès replicatiu i alhora eliminar l'acció del *checkpoint* de fase S) o no foren tractades (les cèl·lules presentaran el *checkpoint* en estat quiescent) (veure Materials i Mètodes 2.7).

Per validar el model es va realitzar un WB utilitzant un anticòs monoclonal específic contra la forma fosforilada de CHK1 en el residu Ser345. Aquesta fosforilació és clau per la localització de la proteïna en el nucli i per la seva activació (Jiang et al., 2003).

En la figura 45A es mostren dos cultius independents. Els primers dos carrils, corresponen a cultius cel·lulars no tractats, en els quals no es detecta la forma activa de CHK1 ja que la ruta està en estat quiescent. En canvi, el tractament amb HU (carrils 3 i 4) provoca un increment significatiu en la fosforilació de CHK1 i, conseqüentment, l'activació del mecanisme de vigilància. Per contra, el tractament combinat amb cafeïna provoca la inhibició ATR, palesa en l'absència de fosforilació de CHK1. Com a control de càrrega es va utilitzar CHK1 total que, alhora, confirma que la forma inactiva de la proteïna és present en tots els extractes.

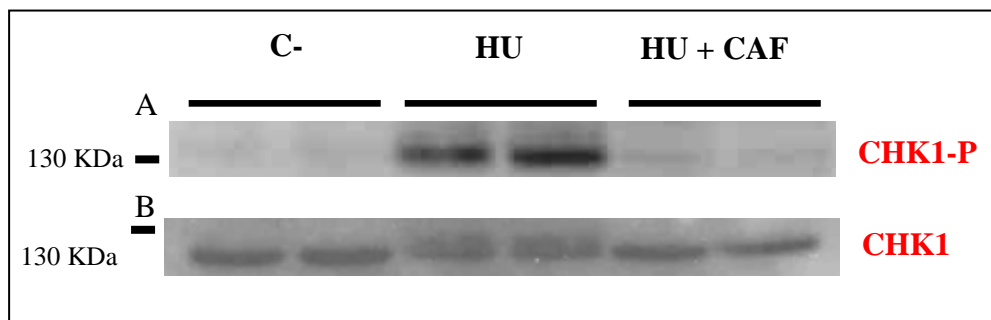


Figura 45. Confirmació del model. (A) WB contra CHK1 fosforilat. Es mostren dos experiments independents en cèl·lules HeLa no tractades (carrils 1 i 2), tractades amb HU (carrils 3 i 4) i amb el tractament combinat HU i cafeïna (carrils 5 i 6). (B) WB anti-CHK1 total en la mateixa membrana.

2.2 Extracció i anàlisi de RNA

Paral·lelament, es tractaren cultius de HeLa sota les mateixes condicions amb l'objectiu d'extreure els RNA i així, hibridar-los amb els microxips d'expressió.

La quantitat i qualitat dels RNA va ser mesurada utilitzant el *BioAnalyzer 2100* (veure Material i Mètodes 2.3.1). Tal i com es mostra a la figura 46, la qualitat dels RNA era molt elevada, ja que els ràtios 18S:28S eren al voltant de 2 en tots els casos i el valor RIN (*RNA Integrity Number*) era sempre superior a 8 (essent 8 el llindar inferior per la realització de microxips).

En la representació gràfica de la microelectroforesi, que s'observa a la dreta de cada electroferograma, no s'aprecien productes de degradació.

Per tant, els resultats del *BioAnalyzer 2100* indicaren un bon estat dels RNA de les diferents mostres i amb una qualitat similar entre ells, molt important per poder comparar els transcriptomes de les diferents situacions a través de microxips d'expressió.

2.3 Microxips d'expressió

El següent pas va ser obtenir els cDNA totals per retortranscripció a partir dels RNA extrets per utilitzar-los, posteriorment, com a motllo per fer les sondes per hibridar en els microxips.

A partir dels cDNA obtinguts es va fer una transcripció *in vitro* amb una RNA polimerasa utilitzant dNTP marcats amb biotina (veure Materials i Mètodes 2.3.3). D'aquesta manera s'obtingueren les sondes de RNA marcades amb biotina per hibridar amb els microxips, aquestes s'anomenen sondes de cRNA (ja que s'han obtingut a partir dels DNA còpia).

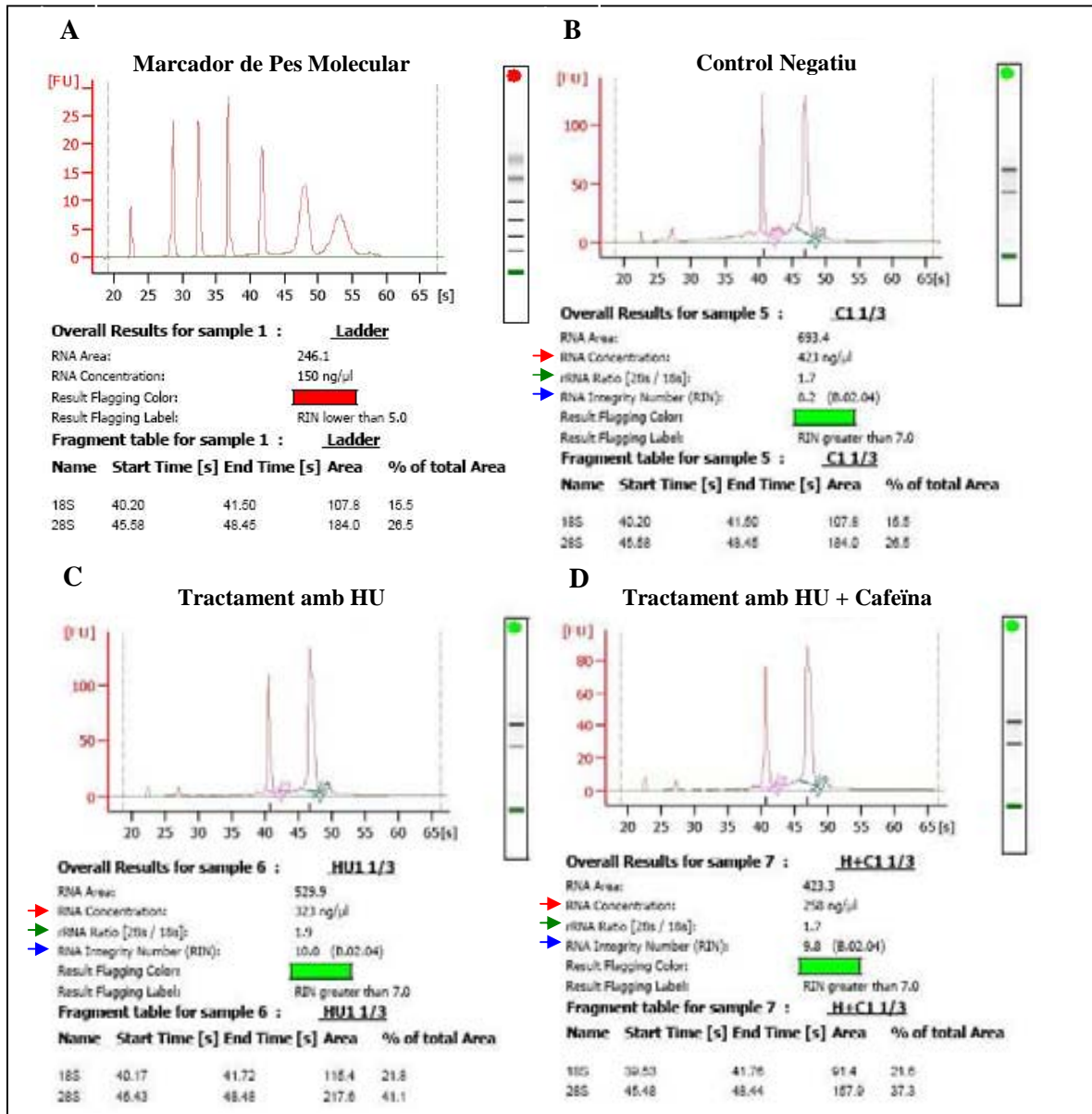


Figura 46. Electroferogrames obtinguts a partir del *BioAnalyzer* 2100. S'observa la concentració (en vermell) i la integritat dels RNA obtinguts: ratio entre els rRNA 28S i 18S (en verd) i el RIN (en blau). En els electroferogrames s'observen els rRNA 18 i 28 S que són els més abundants. A) Marcadors utilitzats en la microelectroforesi capil·lar, (B) cèl·lules no tractades, (C) cèl·lules tractades amb HU i (D) cèl·lules tractades amb HU i cafeïna.

Un cop foren purificades les sondes de cRNA, la seva quantitat i qualitat va ser confirmada novament amb el *BioAnalyzer* 2100.

A la figura 47 s'observen els electroferogrames dels cRNA obtinguts de les transcripcions *in vitro* dels cDNA de cada experiment. En totes les gràfiques es veu un pic cap els 25 segons de microelectroforesi corresponent a un marcador de 25 nucleòtids necessari per calibrar el programa informàtic. S'observa que els cRNA són llegits en l'interval entre 25 i 55 segons de la microelectroforesi. Gràcies a la presència dels marcadors de pes molecular es pot estimar la mida dels cRNA en funció del temps en que han estat llegits com es mostra a la figura 49A. Les sondes generades presenten mides molt variables que van des dels 150 a 4000 nucleòtids, ja que representen la gran diversitat de transcrits humans.

Els oligonucleòtids fixats a la superfície dels microxips, presenten mides al voltant de 25 bases, mentre que els cRNA inicials presentaven mides força més grans i variades. Si s'hibridessin directament els cRNA amb els microxips, es podrien produir, en un elevat número de casos, hibridacions febles que provocarien la pèrdua de la interacció en els rentats posteriors i, conseqüentment, la pèrdua de senyal, reduint així l'eficàcia de detecció dels microxips. Per obtenir una millor hibridació les sondes de cRNA foren fragmentades. Es va realitzar una fragmentació metàl·lica (veure Materials i Mètodes 2.3.4), generant així fragments de cRNA de mides compreses entre 25 i 200 nucleòtids, més adients per generar hibridacions fortes amb els oligonucleòtids dels microxips.

Per confirmar la fragmentació de les sondes es va fer un nou anàlisi amb el *BioAnalyzer* 2100.

Els fragments de cRNA han de ser llegits pel lector de fluorescència en l'interval de temps entre els 25 i 30 segons durant la microelectroforesi nanocapil·lar com s'aprecia a la figura 48. A la figura 49B s'observa l'estimació de la mida dels cRNA fragmentats en funció del temps en el que són llegits a la microelectroforesi.

D'aquesta manera es confirmà que la mida dels fragments generats pels diferents tractaments s'ajustaven als valors esperats, és a dir, entre els 25 i 200 nucleòtids.

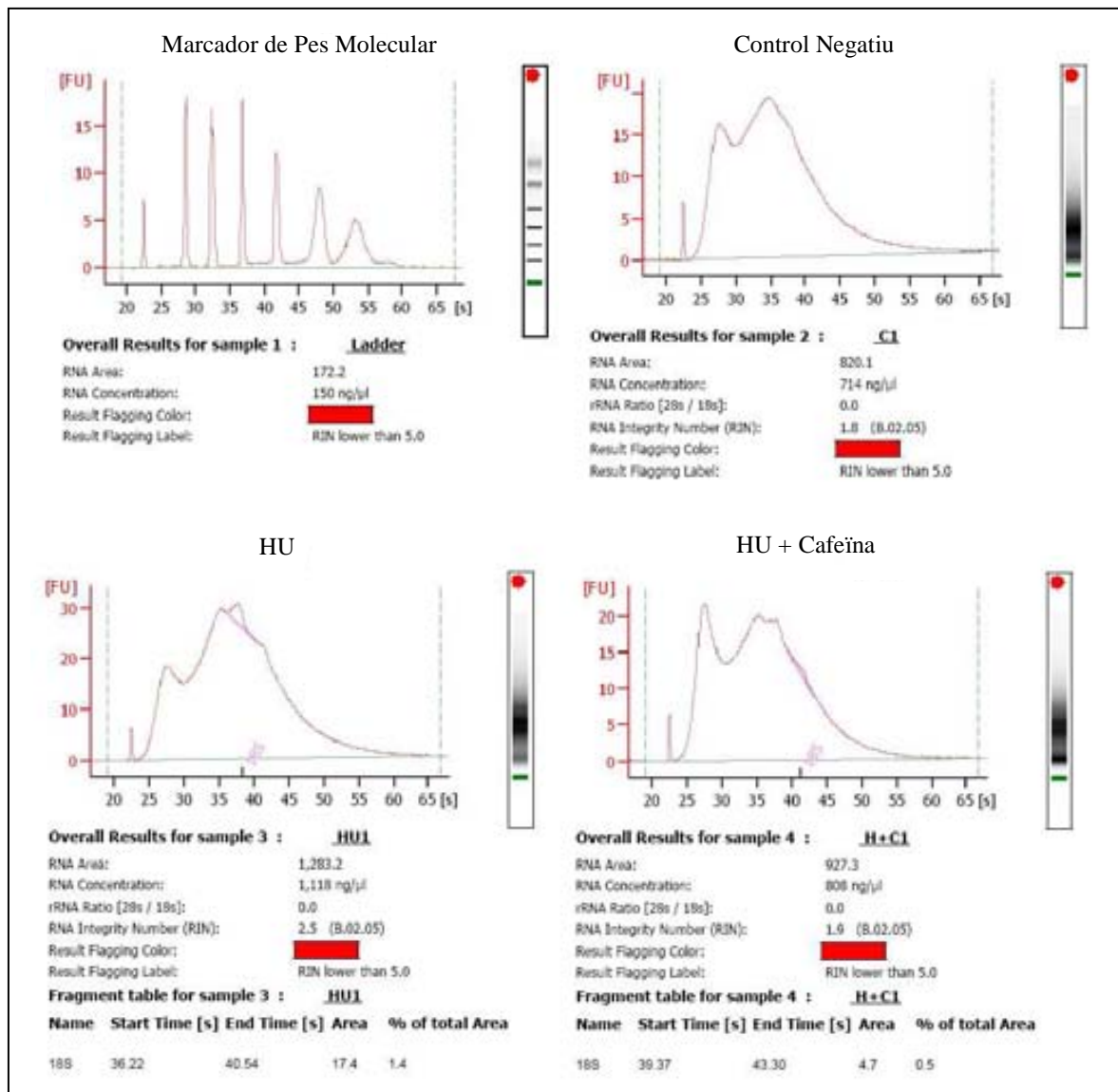


Figura 47. Electroferogrames del *BioAnalyzer 2100*. S'observa la distribució dels pesos moleculars de les sondes de cRNA obtingudes a partir de la transcripció *in vitro* dels DNA còpia en cada tractament.

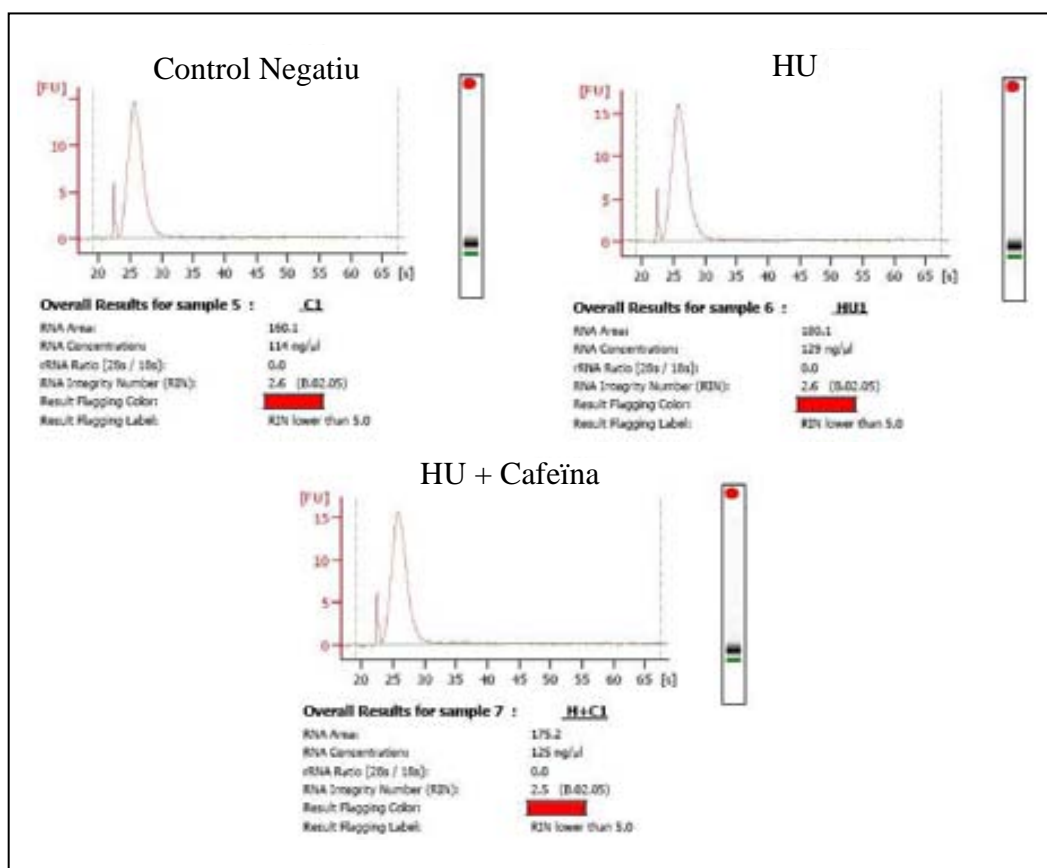


Figura 48. Electroferogrames del *BioAnalyzer* 2100. S'observa el resultat de la fragmentació mecànica de les sondes de cRNA. En els tres tractaments s'aprecia que els fragments generats són llegits pel lector de fluorescència en l'interval corresponent als 25-30 segons des de l'inici de la microelectroforesi.

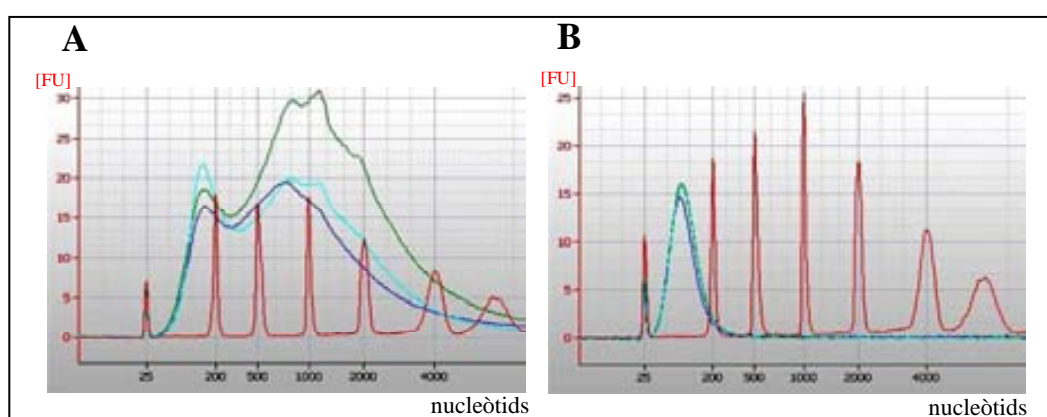


Figura 49. Superposició dels electroferogrames dels marcadors de pes molecular i de les mostres en una gràfica que representa fluorescència en funció de la mida. (A) representa els resultats de l'obtenció dels cRNA. (●) Control negatiu, (●) HU i (●) HU + cafeïna. (B) representa els resultats de la fragmentació dels cRNA. (●) Control negatiu, (●) HU i (●) HU + cafeïna.

Les sondes fragmentades van ser hibridades amb els microxips *Human Genome U133 Plus 2.0* d’Affymetrix. S’utilitzà un microxip independent per cada tractament tal i com s’explica al punt 2.3.5.

Aquest microxip d’Affymetrix presenta 54.675 grups de sondes formades per $1,3 \times 10^6$ oligonucleòtids fixats a la matriu que representen uns 47.000 transcrits amb diferents variants, incloent 38.500 gens ben caracteritzats.

Un cop les sondes de cRNA van ser utilitzades per hibridar els microxips, es procedí als rentats per eliminar l’excés de sonda i les hibridacions no específiques.

Els microxips es van revelar a través de la detecció de senyal fluorescent. Es van tenir en dos rondes de tinció, per tal d’amplificar la senyal, com s’explica en el punt 2.3.6.

La detecció de la senyal fluorescent per cada microxip es va efectuar utilitzant un scanner GeneChip® Scanner 3000 (Affymetrix). Les imatges fluorescentes obtingudes de cada microxip es mostren a la figura 50.

El primer pas per fer l’anàlisi, fou normalitzar les dades crues de fluorescència de tots tres microxips de manera conjunta, per fer-ho s’utilitzà el sistema de normalització RMA (*Robust Microarray Analysis*) (Irizarry et al., 2003). És el sistema més utilitzat actualment en la normalització de dades. Permet tenir en compte aquells punts que presenten una fluorescència inferior al nivell de detecció, cosa que evita la pèrdua d’autèntics punts de fluorescència significativament diferents entre les situacions a comparar, corresponents a gens que en circumstàncies determinades no s’expressen.

Els sistemes de normalització clàssics, com el d-Chip (Li and Hung Wong, 2001) quan no detecta fluorescència en un punt el consideren absent i ja no el té en compte per les successives comparacions.

Aquest sistema de normalització iguala la fluorescència mitja de tots els microxips a comparar, reduint així la diferència en el rendiment que es pugui haver produït en la hibridació de cadascun d’ells (veure Materials i Mètodes 2.3.8).

Un cop es tingueren tots els valors normalitzats es procedí a la comparació dels transcriptomes entre els diferents tractaments aplicats als cultius de cèl·lules HeLa.

Com que la cafeïna no és capaç d’inhibir al 100% l’activació del *checkpoint* de fase S en quatre hores de tractament, ja que sempre s’observa una petita banda de CHK1 fosforilat (figura 45A), es va comparar el microxip de les cèl·lules tractades amb HU amb el de les cèl·lules no tractades per tal d’obtenir els gens que s’expressaven de manera diferencial.

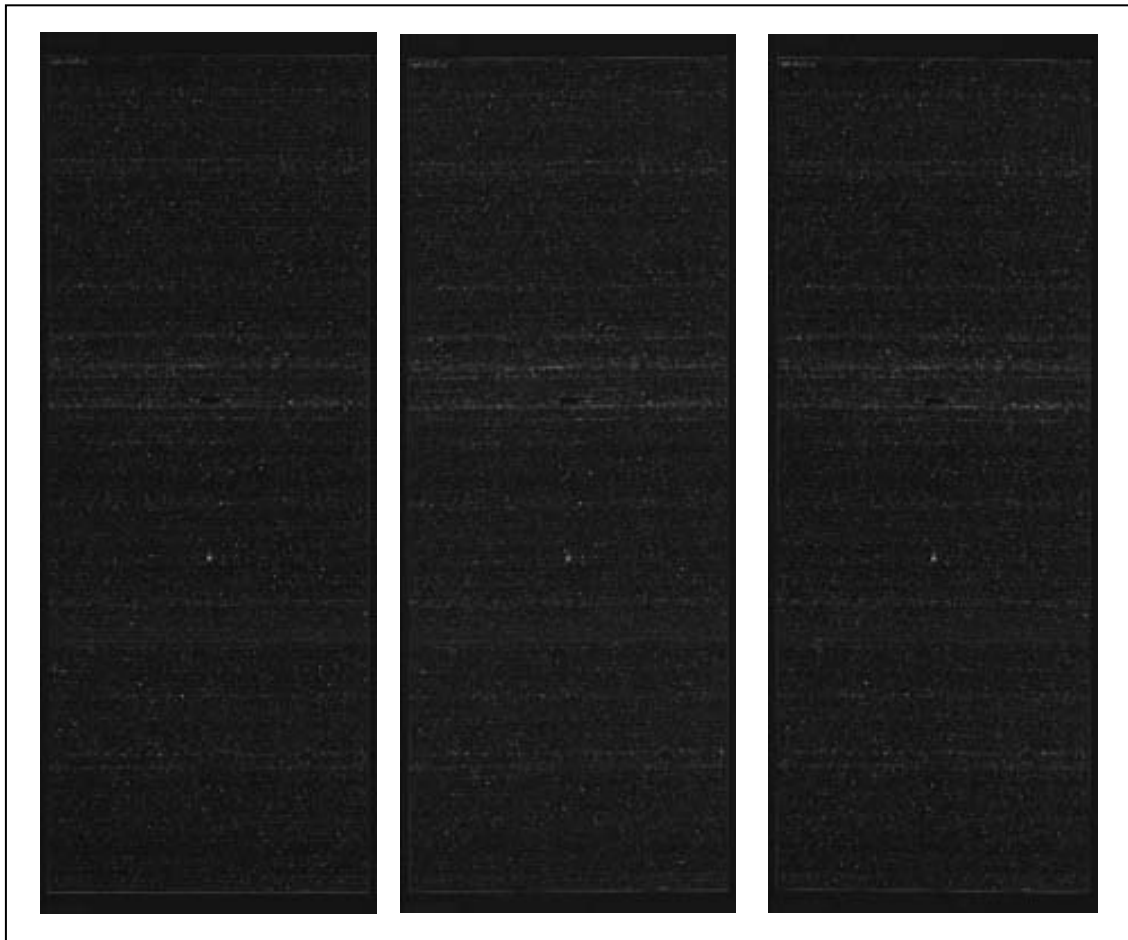


Figura 50. Imatges fluorescents dels microxips realitzats. La imatge de l'esquerra correspon al transcriptoma de les cèl·lules control, la del centre al transcriptoma de les cèl·lules amb el *checkpoint* de fase S activat pel tractament amb HU i la de la dreta al de les cèl·lules en condicions d'estrès replicatiu amb el mecanisme inhibït per efecte de la cafeïna.

Ja que l'objectiu va consistir en realitzar un estudi a gran escala per buscar nous candidats a ser dianes transcripcionals del *checkpoint* de fase S per després confirmar-los individualment, no es considerà necessària l'obtenció de rèpliques independents dels microxips. Així doncs, per establir un canvi d'expressió estadísticament significatiu es va comparar l'expressió dels gens constitutius en els cultius tractats amb HU versus els no tractats. Aquests gens codifiquen per proteïnes que són constantment requerides per la cèl·lula, per aquest motiu la seva expressió és sempre constant. Es va assumir que l'expressió dels gens constitutius no es veuria afectada pels tractaments experimentals emprats. Disposàvem d'una llista formada per 1442 sondes corresponents a gens constitutius publicada per Affymetrix.

Es va estimar que el canvi estadísticament significatiu seria la mitja aritmètica dels canvis obtinguts per les sondes dels gens d'expressió constitutiva entre els cultius tractats amb HU envers el control negatiu +/- tres vegades el seu error estàndard. La mitja aritmètica, representada a la figura 51, va ser 1,068, confirmant així que l'expressió d'aquests gens no variava entre els tractaments. L'error estàndard va ser 0,347. per tant, el valor obtingut finalment va ser de 2,5. És adir, que els gens sobreexpressats o subexpressats 2,5 vegades en el tractament amb HU envers el control negatiu van ser considerats com a candidats a ser dianes transcripcionals del *checkpoint* de fase S. En la figura 51 es mostra un exemple representatiu de la comparació dels gens d'expressió constitutiva entre el tractament amb HU i els nivells d'expressió basal.

En aquestes condicions es van obtenir un total de 159 seqüències que presentaven un canvi d'expressió de 2,5 vegades entre el tractament d'HU envers el control negatiu, de les quals 18 eren subexpressades i 141 sobreexpressades.

Per descartar com a candidats els gens que responen al tractament d'HU d'una manera independent del *checkpoint* de fase S, és a dir, falsos positius, es va establir un patró específic d'activació pel *checkpoint* que havien de complir les seqüències candidates. Consisteix en què els gens sobre o subexpressats estadísticament significatius en el tractament amb HU envers el control negatiu, havien de retornar a la seva expressió basal en el tractament combinat d'HU i cafeïna. Com a les 4 hores la cafeïna no és capaç d'inhibir totalment l'activació del *checkpoint*, es van seleccionar aquells gens que presentaven una expressió intermèdia en el tractament combinat en referència al d'HU i el control negatiu.

En la figura 52 es mostra un exemple d'un gen seleccionat i un fals positiu. El gen descartat és TBL1XR1, aquest presenta un increment superior a 2,5 vegades en el tractament amb HU. Però el valor d'expressió normalitzat en el tractament combinat d'HU i cafeïna, l'increment és més elevat que en HU per si sol. Per tant, es considerà que no seguia el patró específic d'activació del *checkpoint* de fase S.

El segon cas assenyalat en la figura 52, és VIL2, l'expressió d'aquest gen puja en el tractament amb HU envers el control negatiu, però alhora torna a baixar en el tractament HU més cafeïna, ajustant-se d'aquesta manera al patró d'activació específic establert. Per tant, aquest gen fou seleccionat.

Unigene(Avadis)	Símbol	Canvi d'expressió HU vs C-	Mitja	Desviación standard	Canvi d'expressió estadístic
Hs.117176	PABPN1	1,107750955	1,068044064	0,347177774	2,5
Hs.131452	DHRX	1,010738355			
Hs.1701	ELAVL3	0,910067639			
Hs.21907	MYST2	1,107819786			
Hs.23978	SAFB	0,968265086			
Hs.241597	SLC6A7	0,967939085			
Hs.292579	PTDSS1	1,108426344			
Hs.314359	EIF3S12	0,924833284			
Hs.376933	GUK1	1,038459001			
Hs.406683	RPS15	1,011710247			
Hs.436578	POLR2F	0,968018082			
Hs.444749	RPL36AL	0,91073105			
Hs.446149	LDHB	1,000134826			
Hs.469728	PAX8	1,091645106			
Hs.471933	FKBP1A	1,037838735			
Hs.474010	PTTG1IP	0,925318787			
Hs.488189	H2AFV	0,984536186			
Hs.499960	SAR1A	0,968295255			
Hs.500375	ENTPD6	0,974443045			
Hs.503134	DHCR7	0,969986491			
Hs.504620	PHD2	0,999061173			
Hs.511605	ANXA2	1,03824235			

Figura 51. Exemple de la comparació dels gens d'expressió constitutiva entre el tractament amb HU i control negatiu. El quadre vermell mostra el valor del canvi entre els tractaments. En cercle vermell es ressalta el valor del canvi estadísticament significatiu obtingut.

Aquesta aproximació ens va permetre reduir les seqüències seleccionades a 137, de les quals 120 corresponien a gens ben caracteritzats, dels quals 113 eren gens sobreexpressats i només 7 subexpressats. Aquests gens es recullen a la taula 7.

ID oligonucleòtid	Símbol del gen	RMA.C-	RMA.HU	RMA.HU+ Cafeïna	Canvi d'expressió (HU vs C-)	Canvi d'expressió (HU vs C-)
201211_s at	DDX3X	69,53763	169,80682	105,95744	2,4419417	up
207265_s at	KDELRL3	128,99889	316,06116	157,93686	2,4501078	un
219679_s at	WAC	110,88783	271,82935	261		
213562_s at	SQLI	66,20736	162,42134	145		
241940_at	ABHD3	17,098711	42,232086	17,0		
214395_x at	EEF1D	118,40789	47,66589	56,8		
217188_s at	C14orf1	88,26514	219,70976	119,48888	2,489202	up
225834_at	FAM72A	488,54843	194,6598	413,49026	2,5097551	down
232238_at	ASPM	105,30673	41,93482	63,612823	2,5112004	down
204092_s at	AURKA	607,73364	241,59148	647,717		
202444_s at	SPFH1	51,485756	129,67061	116,84016		
228746_s at	CDV3	131,96466	333,34818	277,65588	2,5260415	up
221428_s at	TBL1XR1	114,98008	290,9456	304,12366	2,5304	up
231576_at	E1NK1	21,370216	54,24875	40,992767	2,5385213	up
216521_s at	BRCC3	35,716522	90,89721	56,393173	2,5449624	up
213470_s at	HNRPH1	77,77298	198,22594	198,61996	2,5487766	up
202137_s at	ZMYND11	52,927006	134,924	78,943504	2,5492465	up
215509_s at	BUB1	27,975393	71,462845	71,7917		
208721_s at	ANAPC5	68,05484	174,04947	91,54235		
1555460_a at	SLC39A6	163,1295	417,87076	366,49417	2,5516075	up
208621_s at	VIL2	63,107735	162,83002	95,685745	2,5801911	up
211088_s at	PLK4	7,061117	18,228739	28,92941	2,5815656	up

Figura 52. Exemple de la selecció o descart dels gens amb expressió diferencial significativa en funció del patró d'activació del checkpoint.

Símbol	RMA.C-	RMA.HU	RMA.HU+ Cafeïna	Canvi d'expressió (Hidroxiurea Vs Control)	Canvi d'expressió (Hidroxiurea Vs Control)
APOOL	17,725643	140,90425	74,42398	7,949175	+
CTNNA1	29,43834	201,92194	120,69816	6,8591485	+
ANP32E	150,10268	869,6228	541,8938	5,7935195	+
PAPOLA	67,103424	375,54156	197,9783	5,596459	+
CDV3	19,743752	104,9961	67,2417	5,3179407	+
SKP2	19,220362	102,07058	50,06753	5,3105445	+
STIP1	76,46285	399,64316	280,44846	5,2266316	+
MET	62,04695	305,51517	222,8162	4,9239354	+
TMED2	124,57113	594,2467	331,43967	4,7703404	+
CCNE2	33,12925	155,96686	47,28281	4,7078295	+
CDK2	35,207577	160,5192	114,03923	4,5592227	+
RP6-213H19	43,757313	197,9153	133,91481	4,523022	+
MATR3	32,318844	145,74269	126,03509	4,5095267	+
TMED2	95,27392	427,83835	255,44807	4,4906135	+
PHACTR2	26,24603	114,5483	62,522263	4,3644047	+
NAB1	11,952131	49,858765	22,898571	4,171538	+
ALPP	155,36104	635,7572	403,26447	4,092128	+
P4HB	96,06592	384,83536	274,10324	4,005951	+
ZNF146	36,5167	143,16356	82,01569	3,9204953	+
ADAM9	27,307358	106,99102	80,11227	3,918029	+
PICALM	41,62332	162,83002	115,59696	3,91199	+
ENO1	1185,5486	4619,0176	3332,1643	3,8961017	+
TFRC	25,07895	97,333954	59,999874	3,8811016	+
HSP90AB1	823,4272	3180,375	2150,0168	3,8623633	+
PLEC1	78,37604	299,50507	179,25546	3,8213856	+
ACTB	1386,3159	5219,746	3673,2566	3,7651923	+
SFRS1	293,2722	1102,9131	701,00665	3,7607148	+
HSPA4	49,344387	181,25972	111,375	3,6733603	+
EXOC5	30,330112	110,0068	65,45632	3,6269827	+
ZNF644	35,5047	128,76054	107,67598	3,6265776	+
SGPP1	51,01035	184,55011	172,6618	3,6178954	+
RAB5A	33,98214	120,796776	101,46728	3,5547137	+
EIF5A	332,17465	1179,8834	776,21796	3,5519972	+
WDR1	37,756626	132,3699	81,9541	3,5058722	+
YWHAZ	264,4818	912,2252	610,3086	3,4491036	+
PTPN11	60,92348	209,18123	137,89375	3,4335074	+
DNAJB4	51,688587	176,98369	124,65256	3,424038	+
ATP6V1A	164,42732	554,69244	352,34827	3,3734813	+
YWHAE	92,40708	311,59048	225,7229	3,3719327	+
OSMR	39,980385	134,27608	84,96758	3,3585489	+
GART	23,604319	79,19421	50,97194	3,3550727	+
ITGB1	412,0621	1374,9062	1195,8777	3,336648	+
PRIM2A	33,26889	110,286865	85,19503	3,3150148	+
TXNDC1	172,18019	569,48535	315,79428	3,307496	+
CTDSPL2	13,318213	43,82082	41,86134	3,2902927	+
VAMP3	76,638596	250,25377	147,08586	3,265375	+
SEPT11	22,02288	71,60277	44,619156	3,2512898	+
EIF2S3	349,888	1135,7393	889,7543	3,246008	+
PIK3C2A	38,873226	125,93681	77,00639	3,23968	+
FLOT2	40,152897	127,82413	72,691124	3,1834347	+

RESULTATS

Símbol	RMA.C-	RMA.HU	RMA.HU+ Cafeïna	Canvi d'expressió (Hidroxiurea Vs Control)	Canvi d'expressió (Hidroxiurea Vs Control)
CALD1	134,74951	428,36414	289,9271	3,178966	+
LAPTM4B	263,25803	836,4473	636,1095	3,1772907	+
PBEF1	49,344387	156,45926	132,53503	3,1707613	+
JAK1	72,88606	230,86832	194,42331	3,1675236	+
ALPPL2	59,742622	189,00038	111,375	3,163577	+
RHOA	397,835	1234,3372	910,7869	3,1026359	+
CLSPN	9,79452	29,976	22,079437	3,0604868	+
METT10D	138,21033	45,190323	68,21318	3,0584054	-
MEX3D	19,316872	58,578804	55,30791	3,0325203	+
NFS1	30,604712	92,393036	68,21318	3,0189154	+
FH	32,997074	99,22671	71,70589	3,0071366	+
EML4	41,588734	124,890625	115,80342	3,0029917	+
RRM1	131,70439	394,7449	306,28864	2,9972038	+
MPP7	57,50336	172,1246	105,95744	2,9932964	+
ARF1	306,21393	915,7403	657,3694	2,9905245	+
MCL1	19,822962	59,142963	28,165226	2,9835584	+
SUPT16H	49,187576	146,71259	91,54235	2,9827163	+
TPD52	163,56958	481,60895	276,36932	2,9443674	+
MRPL30	41,63365	122,14979	79,823296	2,9339194	+
ZNF317	17,27886	50,692307	38,1805	2,933776	+
ALPL	27,017677	79,12058	65,9868	2,9284747	+
ARHGDI1A	12,807377	37,272133	22,079437	2,9102082	+
PSAT1	200,93927	583,1727	362,70074	2,9022338	+
NUMA1	26,73341	77,23901	56,99094	2,8892317	+
MET	51,688587	149,26707	120,4305	2,887815	+
SGOL2	271,98392	94,348206	215,37204	2,8827672	-
SCOC	18,935936	54,303394	26,356764	2,8677428	+
SYT7	57,68794	164,48407	129,98433	2,851273	+
PRKCI	11,457968	32,524826	24,650087	2,838621	+
ATP11A	32,89117	93,24827	84,31289	2,8350546	+
CANX	366,6011	1037,1294	805,4447	2,8290405	+
CLIP1	22,91791	64,78148	50,52732	2,826675	+
CCNB1	455,64972	161,34087	260,28058	2,8241432	-
TMEM49	42,447975	119,266266	66,72312	2,8097045	+
MSH6	243,71085	684,38617	584,745	2,8081894	+
BRIP1	18,368057	51,51064	39,094795	2,8043597	+
MBNL1	48,526676	136,07082	99,7689	2,8040416	+
SPTBN1	105,369545	293,48163	291,14548	2,7852604	+
HIST1H4C	2461,7305	886,4737	1479,9689	2,7769923	-
RFC3	156,77005	434,82578	289,76654	2,7736533	+
GDI2	474,72974	1306,7561	955,4287	2,7526317	+
PSEN1	39,981544	108,8295	102,43968	2,7219932	+
VAMP3	191,76279	520,6909	347,21783	2,7152865	+
PBRM1	16,270885	43,989605	38,1805	2,7035775	+
REL	48,176292	17,832558	24,224386	2,701592	-
VIL2	113,31667	305,7154	189,3295	2,6978853	+
FAM62B	34,348003	92,61005	64,582146	2,696228	+
TAF9B	13,386215	35,99759	18,810541	2,6891537	+
CCT2	619,57043	1662,066	1288,5505	2,68261	+
HIST1H2BG	85,61172	32,173683	69,99743	2,660924	-

Símbol	RMA.C-	RMA.HU	RMA.HU+ Cafeïna	Canvi d'expressió (Hidroxiurea Vs Control)	Canvi d'expressió (Hidroxiurea Vs Control)
HERC4	44,479866	118,31084	106,099625	2,659874	+
TP53	34,574814	91,55839	58,120213	2,648124	+
RBM14	12,713187	33,582703	22,898571	2,6415641	+
MLSTD2	30,604712	80,544815	50,396645	2,6317785	+
RBBP4	253,86034	667,5259	542,0625	2,6295004	+
RAB23	37,43832	98,20421	74,42398	2,6230934	+
SCARB2	46,612175	122,14979	95,20061	2,6205554	+
FIGNL1	88,12417	230,86832	127,32918	2,619807	+
GFM2	47,05659	123,10688	112,742516	2,6161451	+
ITGB1	460,50974	1203,9204	1129,1316	2,6143212	+
SRPR	19,134228	49,714436	36,357754	2,598194	+
VIL2	63,107735	162,83002	95,685745	2,5801911	+
SLC39A6	163,1285	417,87076	366,48117	2,561605	+
ANAPC5	68,05484	174,04947	91,54235	2,5574884	+
ZMYND11	52,927006	134,924	78,943504	2,5492465	+
BRCC3	35,716522	90,89721	56,393173	2,5449624	+
ETNK1	21,370216	54,24875	40,992767	2,5385213	+
CDV3	131,96466	333,34818	277,65588	2,5260415	+
ERLIN1	51,485756	129,67061	116,840164	2,5185726	+
ASPM	105,30673	41,93482	63,612823	2,5112004	-

Taula 7. Gens que presenten diferències significatives entre el tractament amb HU versus els cultius no tractats i que segueixen el patró d'activació específic del *checkpoint* de fase S. La primera columna mostra el símbol del gen. Les tres següents els valors normalitzats amb l'algoritme RMA de les expressions en els difrents tractaments. L'última indica si el gen és sobre (+) o subexpressat (-).

Per fer una estimació funcional global dels resultats obtinguts en els microxips d'expressió dependents de l'activació del *checkpoint* de fase S es va utilitzar el paquet informàtic *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA).

El programa IPA va permetre assignar els gens de la llista d'entrada dins de categories funcionals basant-se en valors p significatius obtinguts a partir d'un text exacte de Fisher. El programa té en compte els gens associats de la llista d'entrada en comparació amb el número total de gens que disposa la base de dades del programa relacionats amb la categoria estudiada. L'IPA disposa d'una base de dades pròpia creada a partir de bases públiques com el *Gene Ontology* (GO), *OMIM*, *KEGG pathway*, *Entrez Gene*, *RefSeq* entre d'altres, així com d'articles publicats, que permet estudiar els grups funcionals més representats relacionant-los en diferents categories: implicacions en malalties humanes, funcions cel·lulars rellevants i rutes metabòliques concretes.

Per fer l'estudi s'introduïren en el programa els 120 gens candidats ben caracteritzats. Els resultats significatius més representatius es troben resumits a la figura 53. Cal destacar que

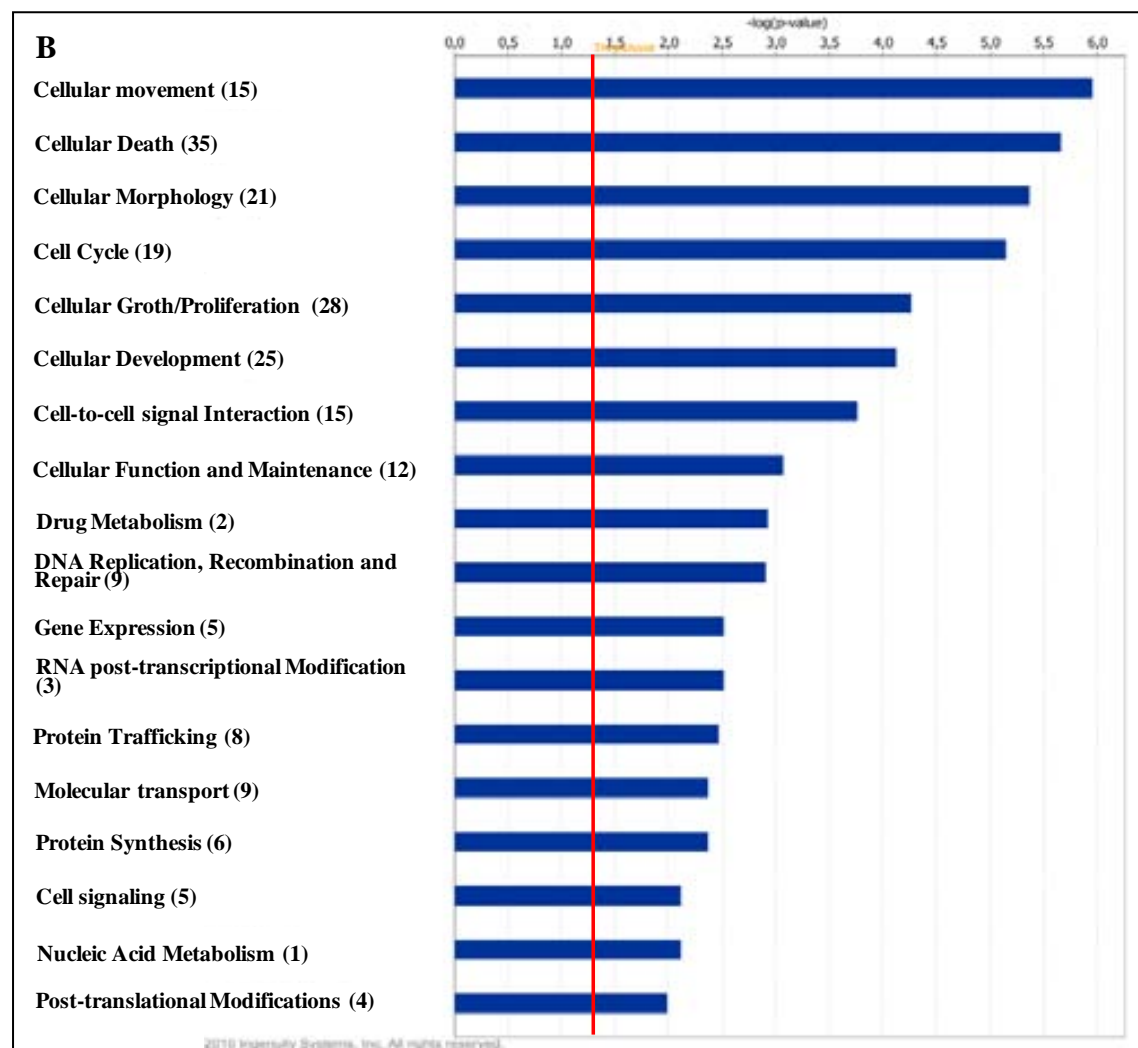
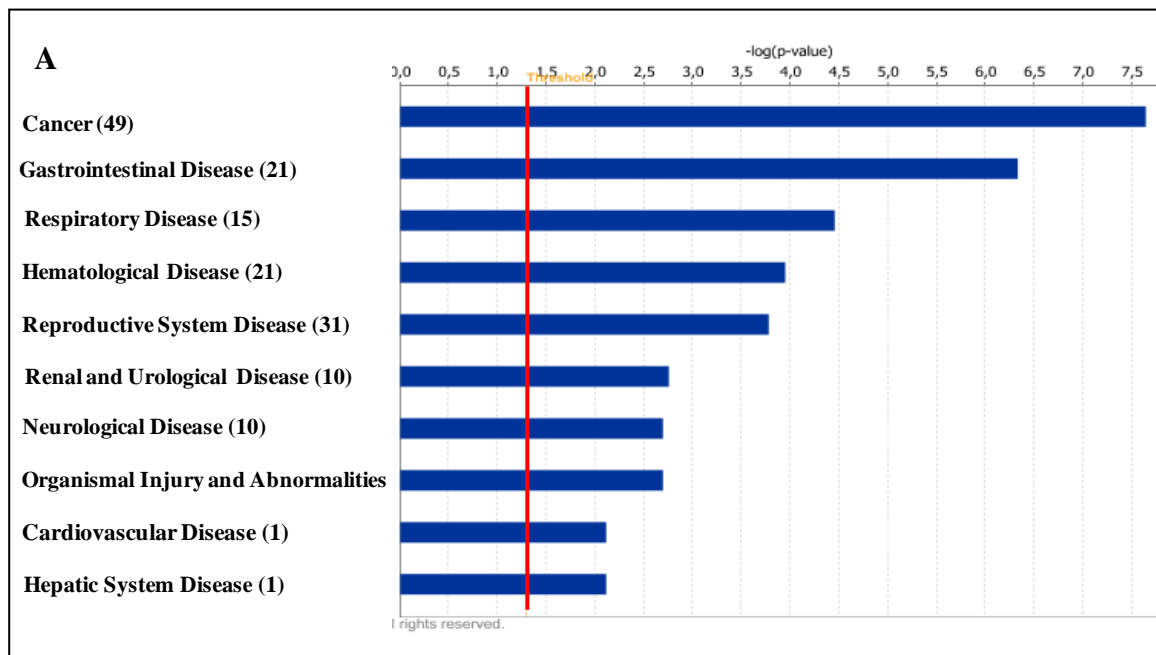
en totes les gràfiques l'eix de coordenades representa el logaritme negatiu del valor p. La línia vermella indica el llindar de significació.

En la figura 53A es relacionen les funcions dels candidats amb el desenvolupament de malalties humanes, on cal destacar la seva àmplia representació en processos tumorals, 49 de les 120 seqüències avaluades. Això concorda i reforça la hipòtesi que la desregulació d'elements controlats pel mecanisme de manteniment de la integritat genòmica afavoreixen la inestabilitat genètica i, en conseqüència, jugaran un rol important en el desenvolupament tumoral. A més, també s'ha de destacar que la patologia gastrointestinal és la segona més representada que és l'objectiu d'estudi del nostre laboratori.

En la figura 53B, es mostren les funcions cel·lulars més representades, es pot apreciar que l'activació del *checkpoint* de fase S controla un elevat número de processos cel·lulars, alguns d'ells com la mort cel·lular (35 seqüències), el cicle cel·lular (19 seqüències), creixement i proliferació cel·lular (28 seqüències), control de la replicació, recombinació i de la reparació (9 seqüències) i metabolisme de drogues (2 seqüències) ajuden a confirmar els resultats dels microxips, ja que és conegut que són processos sobre els que el *checkpoint* exerceix la seva resposta. Tot i que d'altres, com la mobilitat, morfologia o la interacció cel·lular resulten processos cel·lulars on la implicació és més sorprenent i nova.

En la figura 53C s'observen les rutes canòniques més representades on destaquen aquelles implicades en el cicle cel·lular i el seu control, com proteïnes implicades en el *checkpoint* G1/S (4 seqüències), i *checkpoint* G2/M (5 seqüències) que comparteixen elements amb el *checkpoint* de fase S, ruta de les MAP quinases (4 seqüències) que es conegut que respon a estrès genotòxic i replicatiu, control de la mitosi (4 seqüències), així com les de resposta a estrès genotòxic representada per les vies regulades pels efectors quinasa CHK (3 seqüències), la regulada per ATM (3 seqüències) que comparteix elements amb la ruta mediada per ATR i la de BRCA1 (3 seqüències), i diferents mecanismes de control d'apoptosi com p53 (3 seqüències), complex 14-3-3 (4 seqüències) i MYC (4 seqüències) reforcen els resultats obtinguts amb els microxips, ja que formen part de rutes metabòliques relacionades prèviament amb el *checkpoint* de fase S.

Cal destacar que dels resultats obtinguts en els microxips apareixen seqüències que ja han estat relacionades prèviament en la resposta del *checkpoint* de fase S, la majoria d'elles com a dines de fosforilació de les quinases transductores centrals i dels efectors (taula 11).



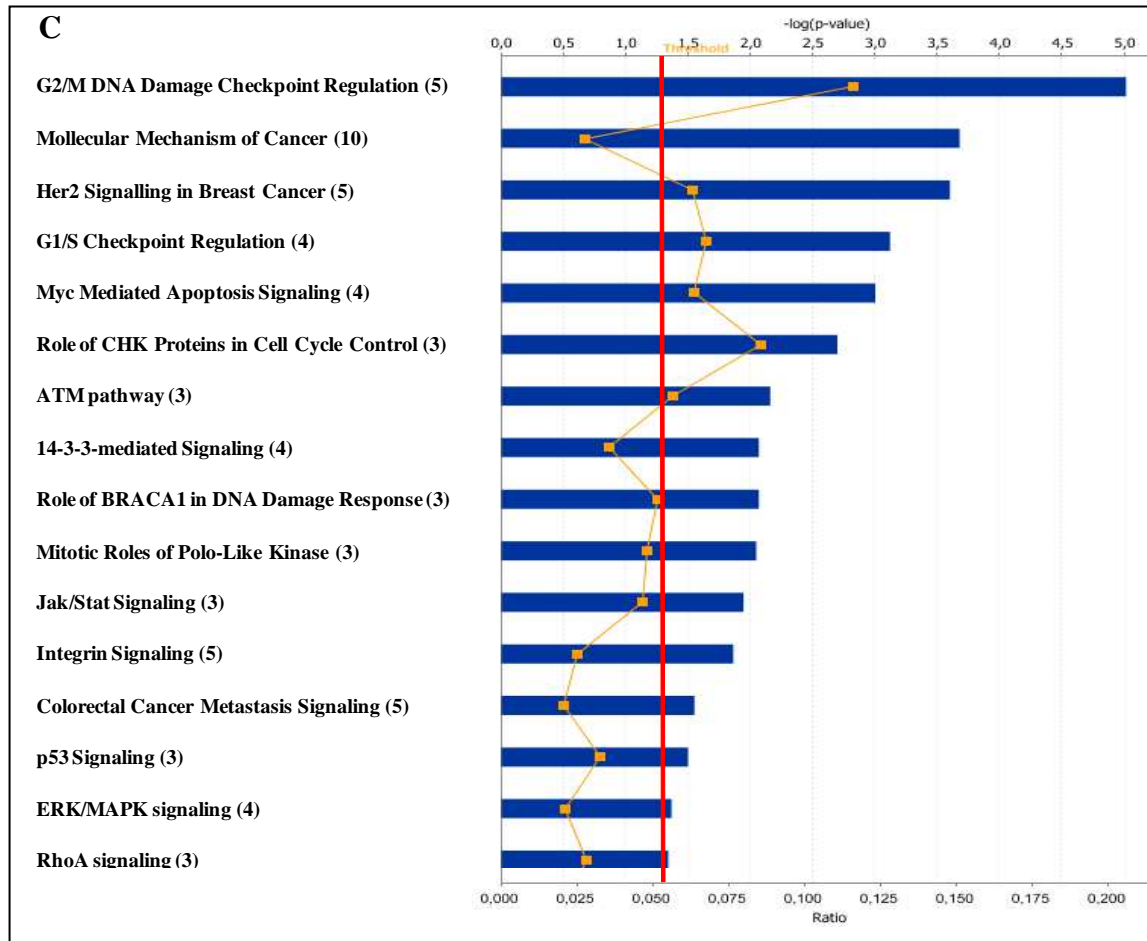


Figura 53. Resultats de l'estudi funcional amb l'IPA dels candidats obtinguts a partir dels microxips d'expressió. (A) Funcions implicades en malalties humanes. (B) Enriquiment de funcions cel·lulars. (C) Rutes canòniques més destacades. Marcat en taronja s'observa el quocient entre els candidats obtinguts i totes les proteïnes assignades per l'*Ingenuity* en cada categoria, a l'eix d'abscisses inferior es mostra el valor del quocient.

En totes les gràfiques l'eix d'abscisses representa el $-\log$ del valor p i es recalca amb una línia vermella el llindar que marca el valor p inferior a 0.05.

Molècula	Funció	Diana del <i>checkpoint</i>	Artícle
CLSPN	Adaptador entre ATR i CHK1	Diana de fosforilació Diana transcripcional	(Kumagai and Dunphy, 2000) (Tsimaratou et al., 2007)
FIGNL1	Funció desconeguda	Putativa diana de fosforilació	(Matsuoka et al., 2007)
HSPA4	Xaperona de funció desconeguda	Putativa diana de fosforilació	(Matsuoka et al., 2007)
HSP90AB1	Xaperona encarregada del plegament d'un gran número de proteïnes	Putativa diana de fosforilació	(Matsuoka et al., 2007)
METT10D	Metiltransferasa de funció desconeguda	Putativa diana de fosforilació	(Matsuoka et al., 2007) (Stokes et al., 2007)
MSH6	Proteïna del complex de reparació de bases mal aparellades	Putativa diana de fosforilació	(Matsuoka et al., 2007)
NUMA1	Component de l'ús mitòtic	Putativa diana de fosforilació	(Matsuoka et al., 2007)
p53	Aturada cicle cel·lular i apoptosi	Diana de fosforilació	(Shieh et al., 1999) (Shieh et al., 2000) (Shiloh, 2001)
PLEC1	Proteïna que actua com ancora del citoesquelet. Forma part del ús mitòtic	Putativa diana de fosforilació	(Matsuoka et al., 2007)
RBM14	Receptor nuclear que regula la transcripció	Putativa diana de fosforilació	(Matsuoka et al., 2007)
RFC3	Membre del complex RAD17-RFC. Senyalització i activació del <i>checkpoint</i>	Putativa diana de fosforilació	(Matsuoka et al., 2007)
RRM1	Ribonucleotí d'eductasa, catalitza el pas de NDP a dNDP	Diana transcripcional	(Filatov et al., 1996)
VAMP3	Proteïna vesicular implicada en el transport	Putativa diana de fosforilació	(Matsuoka et al., 2007)
ZMYND11	Funció desconeguda	Putativa diana de fosforilació	(Matsuoka et al., 2007)

Taula 11. Candidats a ser dianes transcripcionals del *checkpoint* de fase S prèviament implicades en la seva resposta. Es mostra la funció de cada proteïna, el tipus de diana del *checkpoint* i l'article on es descriu.

Aquests resultats ajuden a la validació dels microxips d'expressió, sobretot el cas de CLSPN i RRM1 que ja estan reportats a la literatura com a dianes transcripcionals. El conjunt suggereix que el sistema de vigilància pel manteniment de l'estabilitat genòmica reforça la seva pròpia acció a nivell de la transcripció de proteïnes que després fosforilarà.

2.4 Validació dels resultats mitjançant PCR a temps real

Per fer una validació quantitativa dels resultats obtinguts als microxips d'expressió es va decidir analitzar 14 candidats dels 120 gens ben caracteritzats que segueixen el patró d'activació específic del *checkpoint* a través de PCR a temps real. Aquestes 14 seqüències

foren agafades de forma que representessin tot el microxip (taula 5), és a dir, que no ens centràrem en aquelles que tenien un canvi d'expressió més gran.

Per fer-ho es van reproduir les condicions emprades en els microxips en dos experiments independents. Es compararen els nivells de mRNA entre el control negatiu i les cèl·lules tractades en condicions activadores del *checkpoint*.

El tractament combinat, HU i cafeïna, s'utilitzà per confirmar que els gens seguien el patró específic d'activació del *checkpoint* de fase S, és a dir, que degut a la inhibició del mecanisme de supervivència l'expressió dels gens presentava una tendència a retornar als seus nivells basals.

Un cop extrets els RNA totals es van córrer en un gel d'agarosa, per tal de comprovar la seva integritat. Com s'aprecia a la figura 54 en tots els carrils del gel s'observen perfectament definides les bandes corresponents als rRNA 18 i 28 S, indicant així l'òptim estat dels RNA per dur a terme les PCR a temps real.

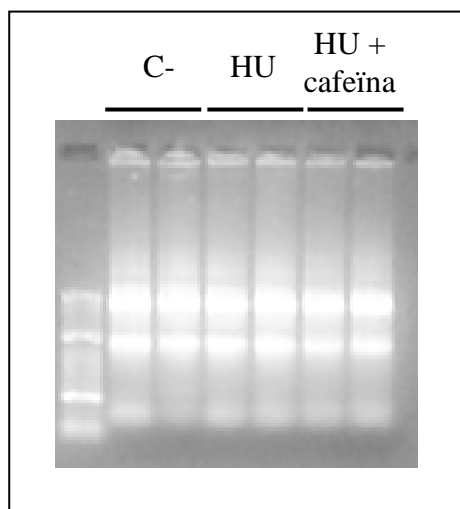


Figura 54. Comprovació dels RNA totals utilitzats per la confirmació dels microxips a través de PCR a temps real. Les mostres foren carregades en un gel d'agarosa 1% per comprovar la seva integritat. En tots els carrils s'aprecien les bandes corresponents als rRNA 18 i 28 S.

Els oligonucleòtids utilitzats en la detecció amb SYBR green foren dissenyats de forma que com a mínim un dels dos hibridés en una zona d'unió entre exons (*Exon Junction*) per eliminar un possible efecte derivat de traces de DNA genòmic residual.

En tots els casos es va fer una corba de dissociació, per confirmar que només hi havia un producte amplificat per reacció i, a més, verificar que els oligonucleòtids no dimeritzaven entre ells. Prèviament es va testar que l'eficiència entre els oligonucleòtids dels gens seleccionats i l'estàndard intern (18 S) fos la mateixa.

Els resultats foren analitzats a través del mètode $\Delta\Delta Ct$ (Yuan et al., 2006).

Els resultats dels experiments independents es troben recollits a la figura 55.

Com ja era conegut que *CLSPN* augmenta la seva expressió de manera dependent de l'activació del *checkpoint* de fase S, l'expressió d'aquest gen es va prendre com a control positiu.

Si es compara l'expressió relativa de les cèl·lules tractades amb HU en funció de l'expressió basal, es pot apreciar que 11 dels 14 gens testats presenten canvis significatius, tant en el cas de les sobreexpressions (*RCF3*, *BRCC3*, *FGNL1*, *PIK2C2A*, *RBM14*, *YWHAE* i *CCNE2*) com en els gens subexpressats (*HIST1H2BG*, *HIST1HAC* i *SGOL2*) (figura 55).

L'expressió de tots aquests gens recupera parcialment els seus valors basals en el cas del doble tractament HU i cafeïna, és a dir, condicions d'estrès replicatiu amb el *checkpoint* de fase S inhibit.

Per contra, 3 dels gens candidats testats no s'adapten als criteris establerts, contradient els resultats obtinguts als microxips. *METT10D*, segons els resultats de la PCR a temps real augmenta l'expressió en condicions activadores del *checkpoint* de fase S, mentre que en el microxip la seva expressió disminuïa.

En el cas de *SUPT16H*, els resultats dels microxips indiquen que l'expressió augmenta significativament en condicions activadores del *checkpoint* de fase S, mentre que els resultats de la PCR a temps real no mostren diferències significatives.

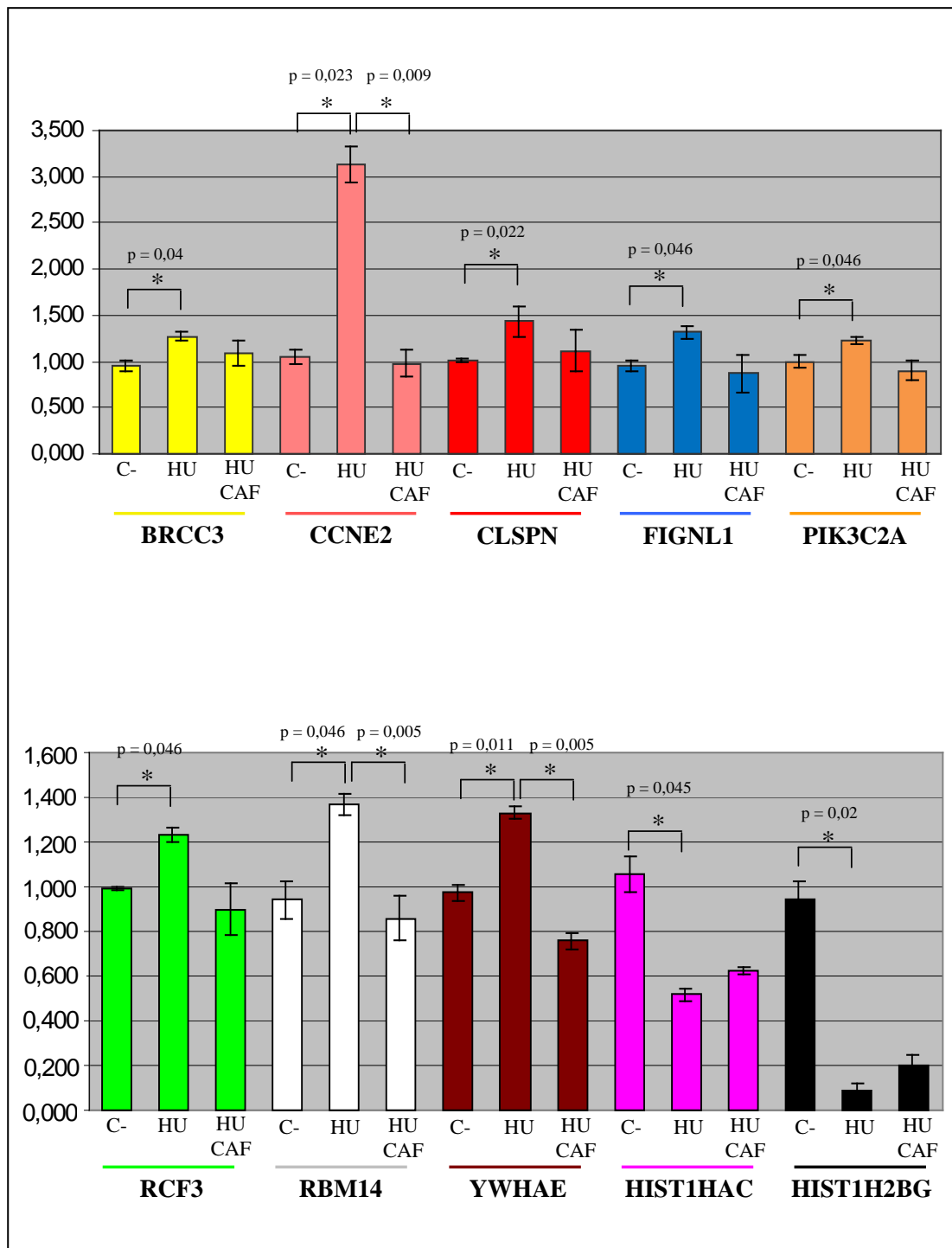
Per últim, els resultats obtinguts per *PLEC1*, com en el cas de *SUPT16H*, no indiquen que es produeixin canvis significatius en la seva expressió sota condicions d'estrès replicatiu.

En funció de les seqüències validades podem estimar que l'especificitat dels resultats dels microxips és d'un 78,5%.

2.5 ESTUDI DE LA CICLINA E2 COM A DIANA DEL CHECKPOINT DE FASE S

Des del punt del control del cicle cel·lular ens va semblar molt interessant la presència de la ciclina E2 com a candidat a diana del *checkpoint* de fase S.

Aquesta proteïna, junt amb la quinasa CDK2 fosforilen les proteïnes de la família del retinoblastoma (*pocket proteins*) que en adoptar l'estat d'hiperfosforilació permeten l'alliberament dels factors de transcripció de la família E2F (Lam and La Thangue, 1994). Aquests regulen la transcripció dels gens que actuen durant la fase S. Un cop els factors de transcripció són alliberats, les cèl·lules adquireixen la facultat irreversible d'iniciar la replicació dels cromosomes i progressar al llarg del cicle cel·lular.



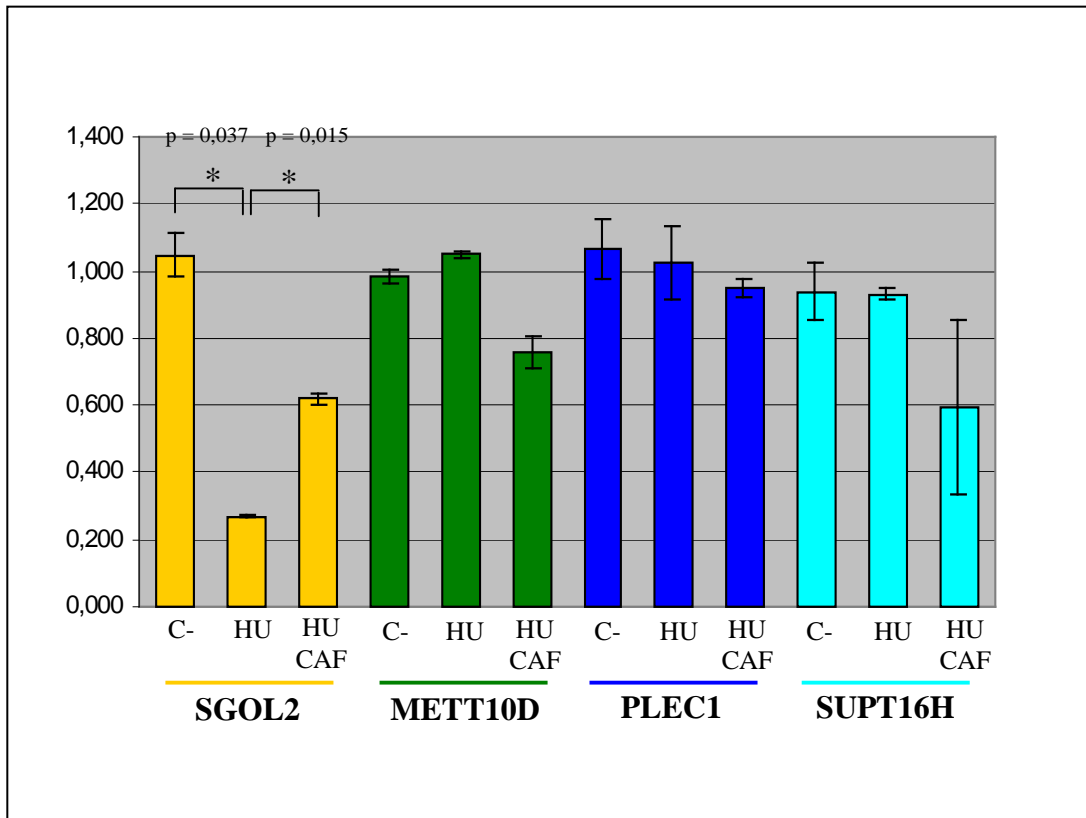


Figura 55. Resultats de les PCR a temps real de 14 candidats a ser diana del *checkpoint* de fase S segons els resultats del microxips d'expressió. Es pot apreciar que 11 són significatius al comparar els nivells basals de mRNA amb els induïts per l'activació del mecanisme de supervivència.

En els microxips d'expressió s'observà que el gen que codifica per la ciclina E2, *CCNE2*, és un dels més induïts en activar-se el mecanisme de vigilància de la integritat genòmica, amb un canvi d'expressió de 4,7 vegades (taula 7). Curiosament, CDK2 també es troba induït en resposta a estrès replicatiu i amb un canvi d'expressió molt semblant al de la ciclina E2 (4,55 vegades) segons els resultats dels microxips.

L'augment de l'expressió de la ciclina E2 en condicions d'estrès replicatiu va ser confirmat per PCR a temps real. El transcrit de la ciclina E2 es detectà augmentat unes tres vegades respecte el control negatiu (figura 55). Paral·lelament, el doble tractament d'HU i cafeïna feia que l'expressió de la ciclina E2 retornés al seu estat basal.

2.5.1 Avaluació dels nivells de ciclina E2 en un cicle cel·lular no pertorbat

El primer pas per confirmar la ciclina E2 com a diana del *checkpoint* de fase S, va ser l'estudi del comportament d'aquesta proteïna en un cicle cel·lular no pertorbat.

Com ja s'ha explicat anteriorment (veure Introducció 2.2.1) les ciclines són proteïnes que estan involucrades en la regulació del control del cicle cel·lular. S'uneixen a les quinases dependent de ciclines (CDK) per tal d'activar-les. Cada ciclina s'uneix a una CDK concreta per a que pugui realitzar la seva funció. És per aquest motiu que els nivells de les ciclines varien en funció de les fases del cicle cel·lular.

Per avaluar els nivells de ciclina E2 en un cicle cel·lular no pertorbat, es sincronitzaren cultius de cèl·lules HeLa amb un doble bloqueig amb timidina a la transició G1/S, ja que un únic tractament amb timidina només produïa un enriquiment (figura 56) i, posteriorment, s'alliberaren de forma sincrònica en fase S (veure Materials i Mètodes 2.7.2). S'agafaren mostres cada 2 hores fins un total de 14 hores per avaluar el cicle cel·lular per FACS i els nivells de la ciclina E2 per WB.

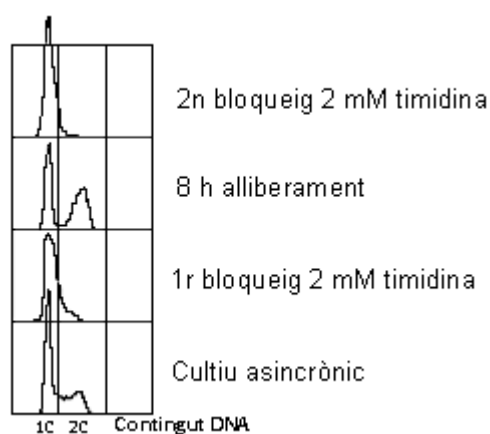


Figura 56. Anàlisi de cicle cel·lular en cultius de cèl·lules HeLa a través de FACS. Es mostra com el perfil obtingut després del primer bloqueig es concentra parcialment en G1/S, mentre que un segon bloqueig aconsegueix una sincronització completa.

La timidina és un precursor del DNA que quan s'afegeix en excés als cultius provoca un desequilibri en els nivells de dNTP endògens inhibint la replicació. Concretament, s'ha observat que produeix un increment en els nivells de dTTP, dGTP i dATP, i una reducció dels de dCTP que correlacionen amb el descens de la síntesi de DNA i conseqüentment provoquen el bloqueig de la progressió cel·lular (Bjursell and Reichard, 1973). Les RNR, enzims encarregats de la síntesi de dNDP a partir de NDP, també regulen que els nivells dels quatre dNTP siguin similars per poder iniciar la replicació (Moore and Hurlbert, 1966). S'ha postulat que l'excés de dTTP generat pel tractament amb timidina produeix una desregulació al·lostèrica de les RNR que induiran la baixada de dCTP i, en conseqüència, s'inhibeix l'entrada en fase S (Bjursell and Reichard, 1973).

El cicle cel·lular es va avaluar per FACS, tal i com es descriu a Materials i Mètodes 2.8.

Com ja s'ha explicat anteriorment, la tècnica de FACS ens permet mesurar el contingut de DNA de les cèl·lules d'un cultiu i en funció de la seva quantitat estimar en la fase del cicle on es troben. Aquesta tècnica ens va permetre veure la sincronització cel·lular després del doble tractament amb timidina i seguir la progressió del cicle després de l'alliberament de forma sincrònica en fase S no pertorbada.

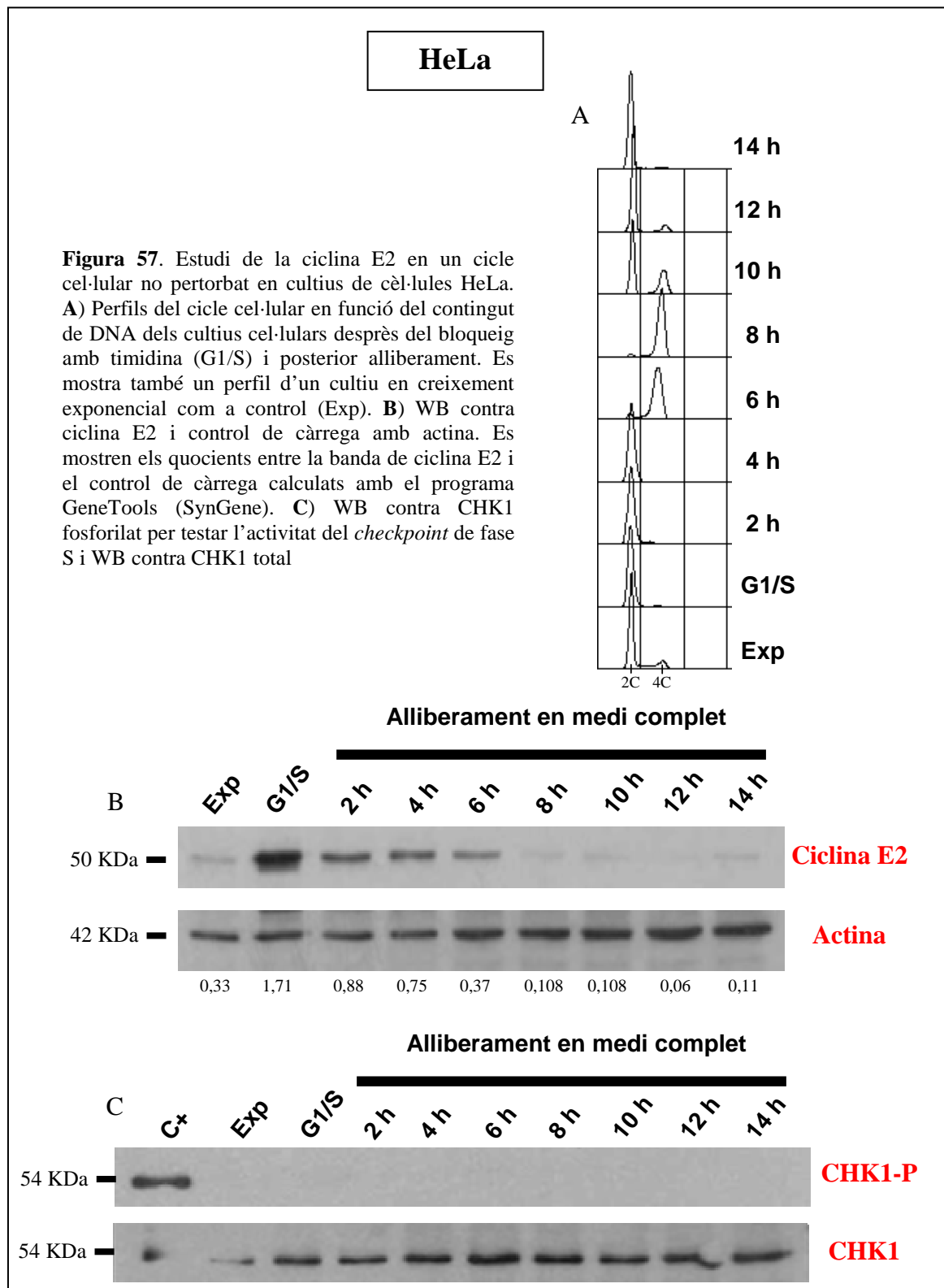
Es va obtenir una bona sincronització en la transició G1/S (figura 57A). La pràctica totalitat del DNA de les cèl·lules del cultiu es disposa al voltant del pic d'un contingut diploide (2N). Pràcticament no s'observà senyal fluorescent al punt corresponent a dos continguts de DNA (4N).

Un cop els cultius foren alliberats del bloqueig induït pel tractament amb timidina, s'observa com les cèl·lules reprenen el cicle. A les 8 hores, s'aprecia com les cèl·lules han finalitzat la replicació, ja que el contingut de DNA del cultiu cel·lular es disposa al voltant del pic de dos continguts diploides (4N). Mentre que a les 14 hores totes les cèl·lules han completat el cicle, ja que es tornen a disposar al voltant del pic que correspon a fase G1.

La cinètica de la ciclina E2 en un cicle no pertorbat es va avaluar per WB (figura 57B). S'aprecia el pic d'acumulació de la ciclina E2 en el carril corresponent a cèl·lules sincronitzades amb timidina (transició G1/S). La quantitat de la ciclina va decaient fins que a les 8 hores desapareix completament, aquest punt coincideix amb el moment que els resultats de FACS indiquen que els cultius han completat el procés de la replicació.

Per testar l'estat funcional del *checkpoint* de fase S en un cicle cel·lular no pertorbat es va fer un WB contra la forma fosforilada de l'efector principal de la via, CHK1.

Com es pot veure a la figura 57C, no s'aprecia cap banda corresponent a la forma activa de la proteïna al llarg de tot a l'experiment, demostrant així que el *checkpoint* de manteniment de la integritat genòmica no presenta activació durant un cycle cel·lular en cèl·lules HeLa on no s'ha induït dany al DNA o estrès replicatiu.



Per confirmar que el WB havia funcionat correctament, es va afegir un control positiu corresponent a un cultiu de cèl·lules HeLa tractades amb HU durant 8 hores (primer carril figura 57C).

Per tant, podem afirmar que la ciclina E2 comença a expressar-se durant la fase G1, presentant un pic d'acumulació màxima en la transició G1/S. Posteriorment la seva presència a la cèl·lula decau fins a desaparèixer en el moment en què les cèl·lules han completat la replicació i entren en G2/M. Aquesta observació concorda amb el que estava reportat a la literatura (Dulic et al., 1992).

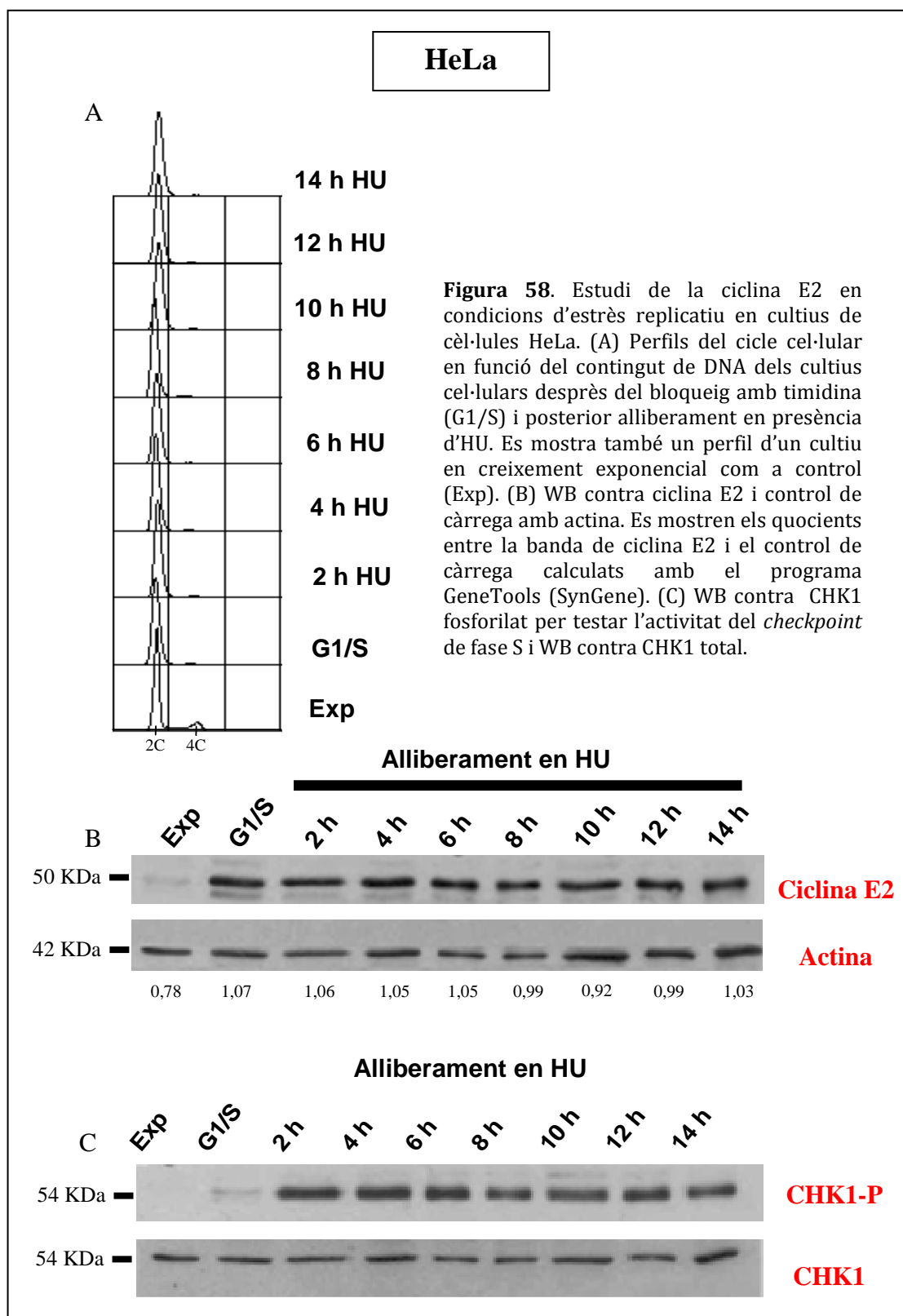
2.5.2 Avaluació dels nivells ciclina E2 en una fase S pertorbada

El següent pas va ser estudiar el comportament de la ciclina E2 en condicions d'estrès replicatiu generades pel tractament dels cultius de cèl·lules HeLa amb HU.

Els cultius es sincronitzaren amb un doble bloqueig de timidina en la transició G1/S i s'alliberaren sincrònicament en fase S en presència d'HU. Igual que en l'experiment anterior s'analitzaren mostres cada 2 hores fins un total de 14 hores.

En la figura 58A es mostren els resultats obtinguts en l'anàlisi per FACS on es pot estudiar la sincronització cel·lular dels cultius de HeLa amb el doble tractament amb timidina i el posterior bloqueig del cycle cel·lular induït per l'efecte de la HU. S'observa una bona sincronització a la transició G1/S, ja que el DNA del cultiu es disposa coincidint amb el pic d'un contingut diploide (2N). De la mateixa manera després de l'alliberament es veu que les cèl·lules no poden progressar al llarg de la fase S degut a la impossibilitat de què completin el procés de la replicació per falta dels dNTP, en tots els temps estudiats s'observa com el DNA cel·lular es continua disposant entorn al pic d'un contingut diploide.

Seguidament es va estudiar la cinètica de la ciclina E2 en condicions d'estrès replicatiu per WB. En la figura 58B s'observa com la ciclina E2 s'acumula durant les 14 hores d'estimulació amb HU, al contrari del que s'apreciava en una fase S no pertorbada on la quantitat de proteïna anava decaient a mesura que la replicació avançava. A més, l'acumulació induïda en condicions de dany al DNA és equiparable a l'expressió en la transició G1/S, és a dir, coincideix amb uns nivells d'acumulació màxims.



Per confirmar l'activació del *checkpoint* de fase S per l'efecte de la HU, es va fer un WB anti-CHK1 fosforilat. Com es mostra a la figura 58C, en tots els carrils des de l'alliberament en presència d'HU, CHK1 es troba en forma activa, indicant així l'activació del mecanisme de manteniment de la integritat genòmica.

El conjunt de dades indiquen que en cultius de cèl·lules HeLa la ciclina E2 s'estabilitza amb una acumulació màxima en condicions d'estrès replicatiu.

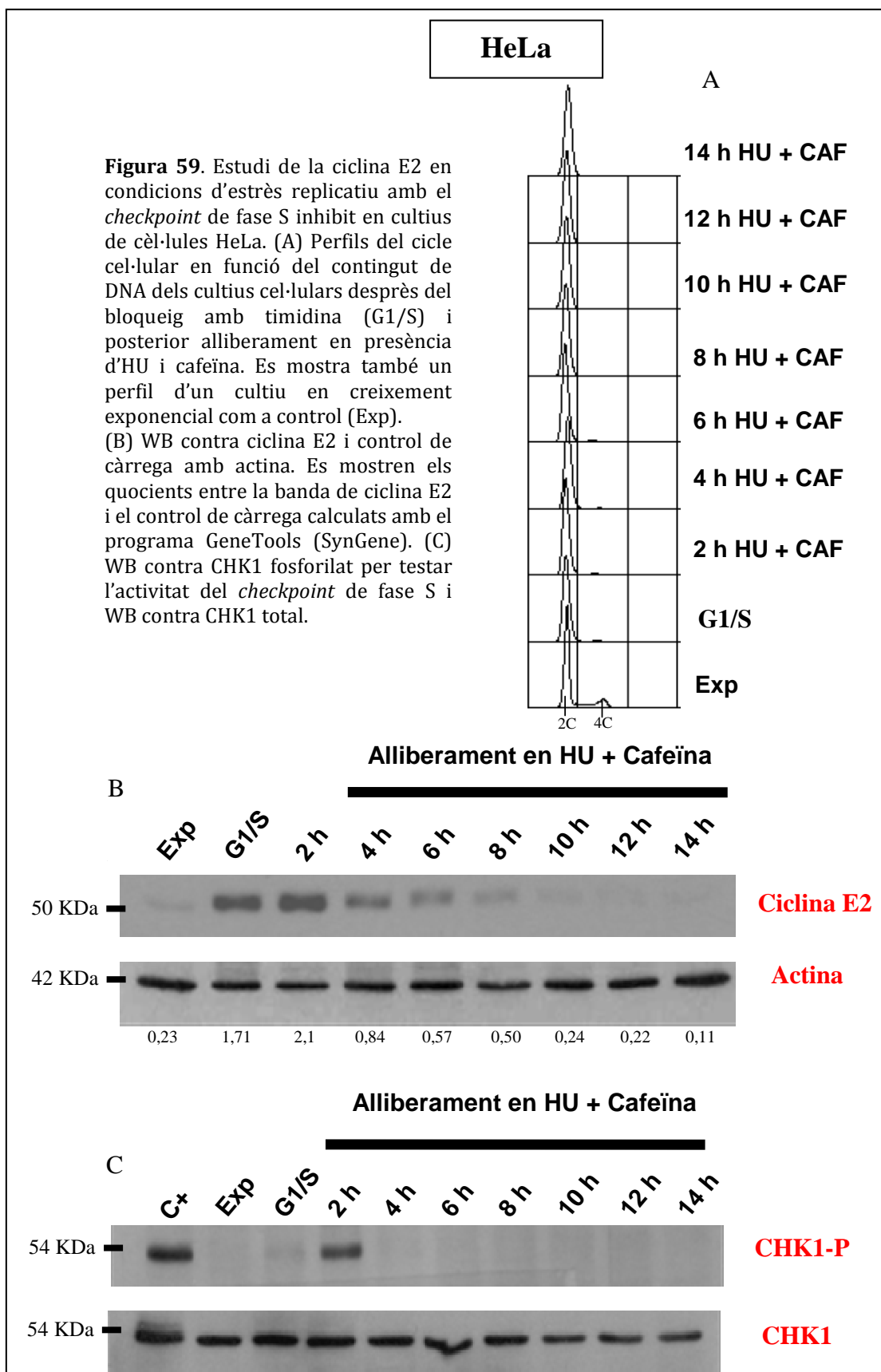
2.5.3 Nivells ciclina E2 en condicions d'estrès replicatiu i *checkpoint* de fase S inhibït

Per poder determinar que l'acumulació de ciclina E2 era produïda d'una manera dependent de l'activació del *checkpoint* de fase S i no per un altre mecanisme induït per l'acció del tractament amb HU, es tornaren a sincronitzar els cultius de cèl·lules HeLa a la transició G1/S, però en aquest cas es van alliberar de forma sincrònica en fase S en presència del doble tractament d'HU i cafeïna, és a dir, en condicions d'estrès replicatiu per la depleció dels nivells de dNTP cel·lulars, però amb el *checkpoint* de fase S inhibït per l'efecte de la cafeïna sobre el transductor central de la via, ATR. En aquestes condicions, tot i que les cèl·lules no podran replicar, seran incapaces d'aturar el cicle cel·lular. S'agafaren mostres cada 2 hores fins un total de 14 hores.

A la figura 59A, s'observa l'anàlisi per FACS, novament s'aprecia una bona sincronització en la transició G1/S i un bloqueig de la fase S posterior a l'alliberament per l'efecte de la HU, ja que els DNA de les cèl·lules del cultius es disposen coincidint amb el pic d'un contingut diploide (2C).

La figura 59B mostra com la ciclina E2 en condicions d'estrès replicatiu conjuntament amb la inhibició del *checkpoint* segueix la mateixa cinètica d'un cicle cel·lular no pertorbat, és a dir, la seva acumulació és màxima en la transició G1/S i comença a desaparèixer un cop les cèl·lules entren en fase S, fins que es deixa de detectar a les 8 hores des de l'alliberament del bloqueig amb timidina.

Aquest resultat reforça que l'acumulació de la ciclina E2 en condicions d'estrès replicatiu depèn de l'activació del *checkpoint* de fase S.



En la figura 59C es demostra que efectivament no hi ha fosforilació de CHK1 confirmant la inhibició del mecanisme de vigilància per l'efecte de la cafeïna.

No obstant això, en el carril corresponent a les 2 hores des de l'alliberació del bloqueig per timidina si que apareix la banda corresponent a CHK1 fosforilat, correlacionant amb un increment dels nivells de ciclina E2 en aquest punt. Aquest efecte podria ser provocat perquè la HU tingui una acció més eficaç que la cafeïna, ja sigui perquè difon més ràpid a les cèl·lules o la depleció de dNTP és més ràpida que la inhibició de la proteïna quinasa ATR. Per aquest motiu a les 2 hores s'aprecia banda de CHK1 fosforilat i conseqüentment hi ha una estabilització de la ciclina E2.

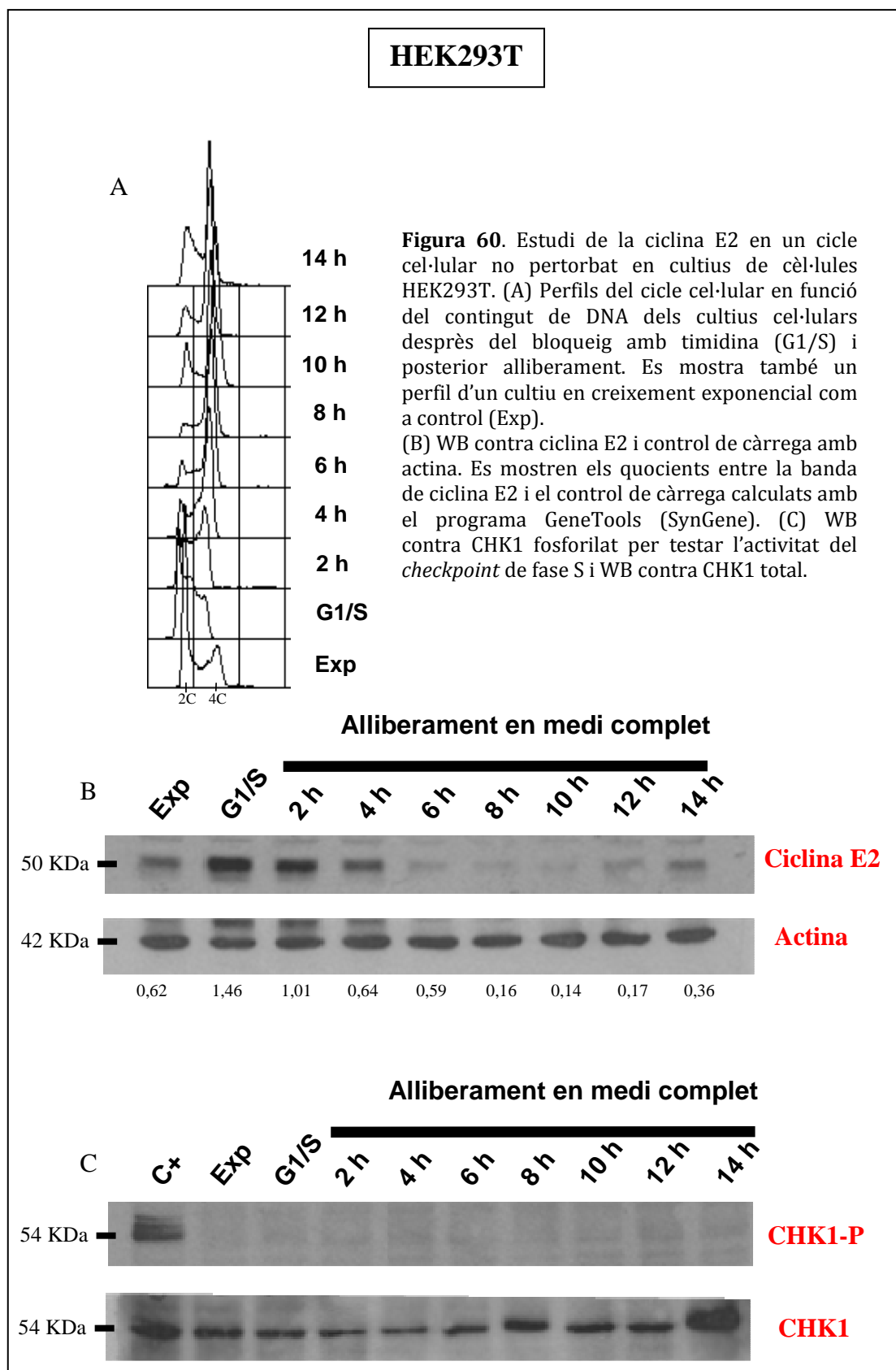
El conjunt de tots aquests resultats indiquen que en cèl·lules HeLa la ciclina E2 és una diana del *checkpoint* de fase S. Els microxips i la PCR a temps real demostren que els nivells del mRNA de la ciclina E2 augmenten d'una manera dependent de l'activació del mecanisme de manteniment de la integritat genòmica. Conseqüentment, els nivells de proteïna són acumulats en resposta a l'activació del mecanisme de supervivència de fase S.

2.5.4 Confirmació de ciclina E2 com a diana del *checkpoint* de fase S en cèl·lules HEK293T

El següent pas va ser estudiar si l'acumulació de la ciclina E2 dependent del mecanisme de vigilància de la fase S és un fenomen universal en cèl·lules humanes o, per contra, és un procés inherent a les cèl·lules HeLa degut al seu fons mutacional.

Per aclarir aquest punt es reproduïren els mateixos experiments en cèl·lules HEK293T. Aquesta línia deriva de cèl·lules epitelials de ronyó embrionari humà que foren immortalitzades amb adenovirus, per tant, no són cèl·lules d'origen tumoral com en el cas de les HeLa.

Com es va fer en els experiments amb cultius de cèl·lules HeLa, primer es va voler comprovar la cinètica de la ciclina E2 en un cicle cel·lular no pertorbat i seguidament el seu comportament en condicions d'estrès replicatiu generats per la presència de HU.



Per estudiar-ho, els cultius de HEK293T es sincronitzaren amb un doble bloqueig de timidina (veure Materials i Mètodes 2.7.1) i s'alliberaren sincrònicament en fase S en medi fresc o en presència d'HU. S'analitzaren mostres cada 2 hores durant les 14 hores totals que durà l'experiment.

Els resultats de citometria de flux d'aquest cultius, indiquen que no s'obtingué un bon grau de sincronització en contra del que succeïa en els cultius de cèl·lules HeLa (figura 60A i 61A), degut a què els temps de tractament amb timidina estan optimitzats per aquesta línia cel·lular i a què les dues línies presenten temps de duplicació lleugerament diferents.

Tot i això, si que es pot apreciar un enriquiment cel·lular en les fases G1 i S, que va ser suficient per dur a terme els experiments.

En la figura 60A s'aprecia com un cop s'alliberaren els cultius en una fase S no pertorbada, la majoria de les cèl·lules progressen en el cicle cel·lular, a les 8 hores són pràcticament totes en fase G2/M, ja que el contingut de DNA es concentra al voltant del pic de dos continguts diploides (4C), confirmant així, que han completat el procés de replicació.

Els nivells de ciclina E2 foren avaluats per WB (figura 60B), els resultats mostren que la proteïna presenta un pic d'acumulació a la transició G1/S que va decaient al llarg de la fase S fins a desaparèixer completament a les 8 hores des de l'alliberament, tal com succeïa en una fase S no pertorbada en cèl·lules HeLa. De totes maneres, les figures de FACS mostren que sempre hi han cèl·lules que presenten un contingut diploide de DNA (2C), és a dir que es troben a fase G1, això explica perquè a partir de les dotze hores des de l'alliberament del bloqueig per timidina ja torna a aparèixer la banda corresponent a la ciclina E2, fenomen que no fou observat en el cas dels cultius de cèl·lules HeLa.

Com era d'esperar les cèl·lules d'aquests cultius no presenten activació del *checkpoint* de fase S, ja que al mantenir-se en estat quiescent no es pot detectar la forma fosforilada de la quinasa CHK1 (figura 60C).

En l'experiment on s'alliberaren els cultius sincrònics en condicions d'estrès replicatiu, els resultats de FACS mostren l'enriquiment en fase G1 després del tractament amb timidina i el posterior bloqueig de la progressió en fase S per la depleció de dNTP (figura 61A). Després de l'alliberament en condicions d'estrès replicatiu es pot apreciar que el DNA de la major part de cèl·lules dels cultius es disposa en la regió compresa entre els dos pics

corresponents a un contingut diploide de DNA (2N) i dos continguts diploides (4N) delimitats per la gràfica corresponent al cultiu en creixement exponencial. Aquesta regió intermèdia correspon a la fase S, on les cèl·lules dels cultius no han progressat després de 14 hores.

Els resultats de la cinètica de la ciclina E2 obtinguts per WB, mostren que els nivells de la ciclina E2 s'acumulen durant les 14 hores que durà l'experiment (figura 61B).

L'activació del *checkpoint* de fase S en aquestes condicions fou confirmada a través d'un WB per visualitzar la forma fosforilada de l'efector central del mecanisme de vigilància, CHK1 (figura 61C).

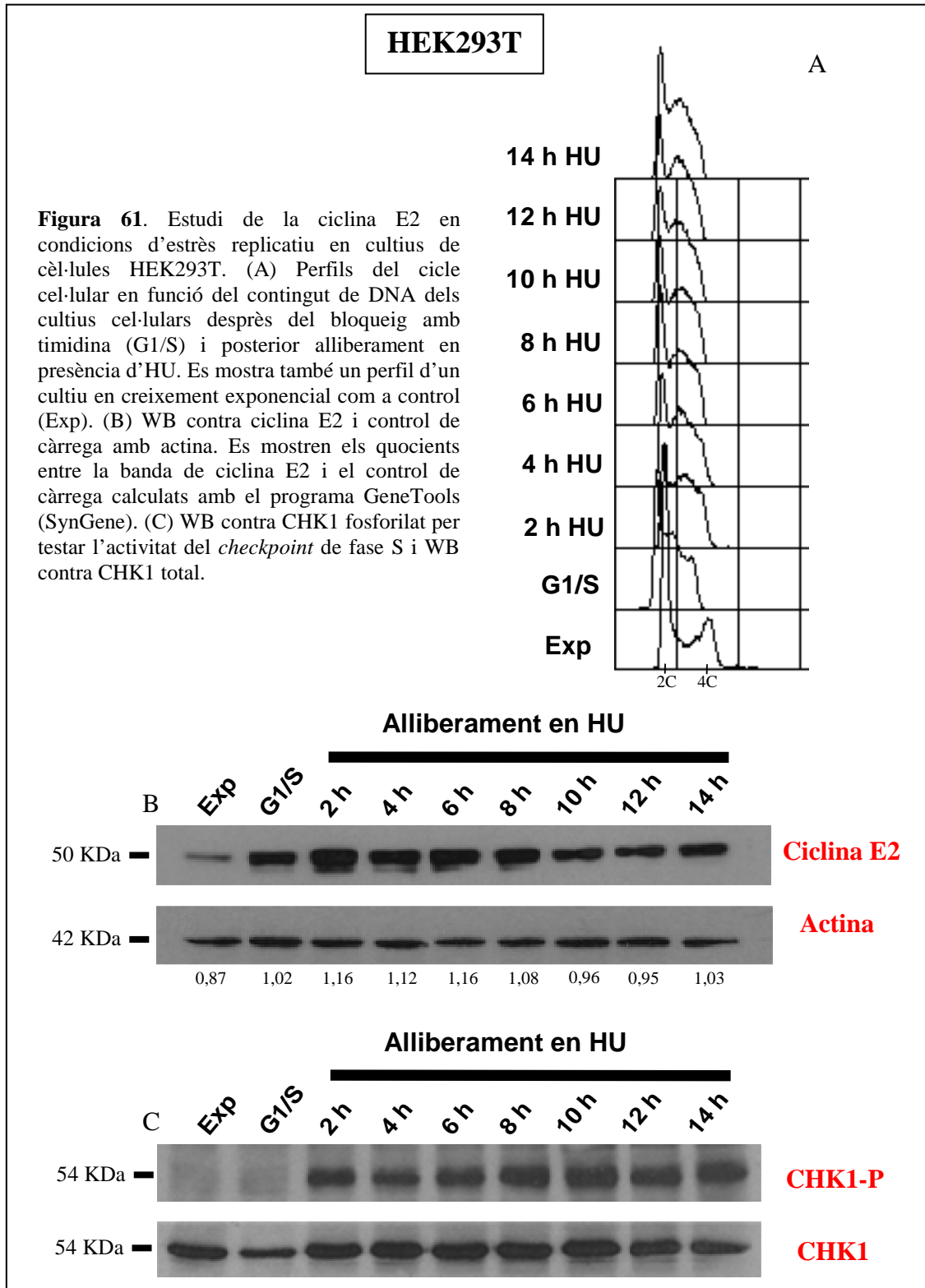
L'experiment d'alliberació en fase S en condicions d'estrès replicatiu amb el *checkpoint* de fase S inhibit, no es va poder fer en cultius de cèl·lules HEK293T, degut a què aquestes cèl·lules presenten una elevada sensibilitat al tractament amb cafeïna. Dos hores després de l'alliberament en presència de cafeïna la major part de les cèl·lules havien perdut la seva capacitat d'adherència a la superfície de les plaques de cultiu.

Tot i això, en els dos experiments realitzats queda palesa que la ciclina E2 s'acumula en condicions d'estrès replicatiu, reproduint el fenomen observat en els cultius de cèl·lules HeLa. Això ens indica que aquest efecte és general en les cèl·lules humanes i com ja fou confirmat en *S. cerevisiae* (Palou et al., 2010), segurament es conserva al llarg de tota l'evolució.

2.5.5 Mecanisme d'acumulació de la ciclina E2 induït pel *checkpoint* de fase S

Els resultats obtinguts en aquest estudi, tant generats pels microxips d'expressió com les PCR a temps real, indiquen que l'activació del *checkpoint* genera un augment dels nivells cel·lulars de RNA missatger del gen *CCNE2*.

Per tal d'avaluar si l'acumulació de la ciclina E2 induïda pel *checkpoint* de fase S requereix síntesi *de novo* de la proteïna a partir d'aquests elevats nivells de mRNA, es va estudiar el comportament de la ciclina E2 en condicions activadores del mecanisme de manteniment de la integritat genòmica inhibint el procés de traducció. Per fer-ho s'utilitzà la cicloheximida



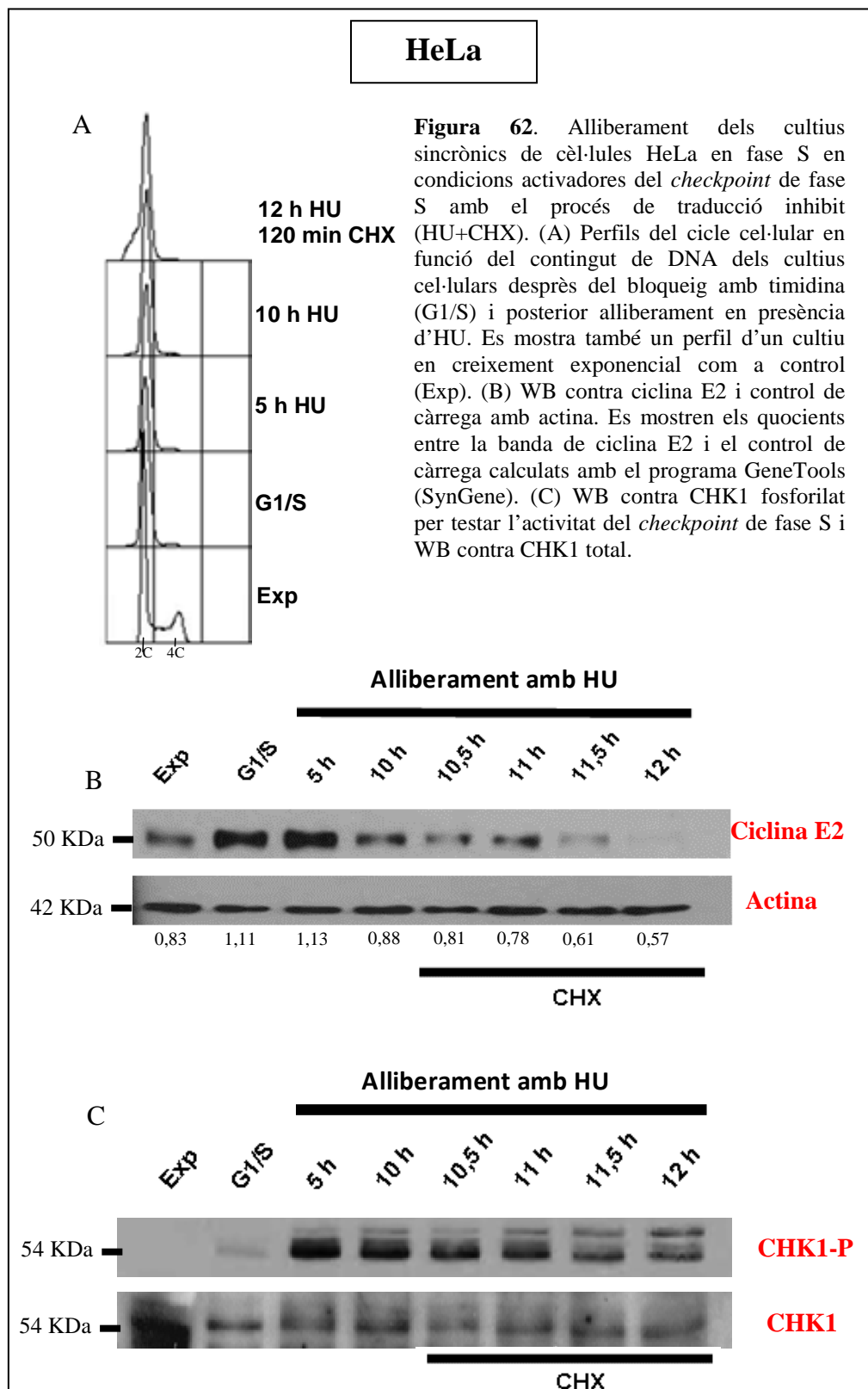
(CHX). Aquest compost és produït pel bacteri *Streptomyces griseus* i és un potent inhibidor de la síntesi proteica en eucariotes superiors. Actua interferint en l'activitat peptidil transferasa de la subunitat 60S del ribosoma, bloquejant l'elongació traduccional (Hardesty et al., 1973; Oberg et al., 1971).

Cultius de cèl·lules HeLa foren sincronitzats a la transició G1/S amb un doble tractament amb timidina i, posteriorment, s'alliberaren de forma sincrònica en fase S en presència d'HU. Després de 10 hores d'estimulació del *checkpoint* de fase S s'addicionà CHX en el medi dels cultius cel·lulars mantenint la HU. S'analitzaren mostres cada 30 minuts durant 2 hores.

En els resultats obtinguts en l'estudi del cicle cel·lular per citometria de flux dels cultius, figura 62A, revelaren una bona sincronització en la transició G1/S, on el DNA de les cèl·lules dels cultius es disposen coincidint amb el pic d'un contingut diploide de DNA. Després de l'alliberació de forma sincrònica en fase S els cultius mantingueren el bloqueig degut a l'efecte de la HU, tant en absència com en presència de CHX.

En la figura 62B es pot observar com la ciclina E2 s'acumula en presència d'HU. 30 minuts després de l'addició de la CHX els nivells de la proteïna decauen fortament, tot i això, els nivells es mantenen bastant estables fins les 2 hores de l'addició de la CHX on desapareixen completament. Això contrasta amb el que succeïa en presència només d'HU que mantienien els nivells elevats de la ciclina durant 14 hores. Aquest resultat indica que la constant síntesi *de novo* de la proteïna és necessària per l'acumulació la proteïna en resposta a l'activació del *checkpoint* de fase S.

Considerant que en cèl·lules humanes la inhibició de la traducció per la CHX és molt ràpida, de l'ordre de minuts, i que la vida mitja de la ciclina E2 és de 30 minuts (Zariwala et al., 1998), si l'acumulació només depengués de la traducció en cada punt avaluat la quantitat de la ciclina E2 hauria de baixar un 50%. Com es pot apreciar en el quocient de la quantificació de la banda de ciclina E2 i l'actina (figura 62B), aquest fenomen no succeeix, la quantitat de la proteïna decau a un ritme més lent. Aquest resultat fa pensar que el *checkpoint* de fase S deu exercir algun altre control, addicional a la regulació transcripcional, sobre l'acumulació de la ciclina.



El WB anti-CHK1 fosforilat, presentà una banda específica corresponent a la forma activa de CHK1 des del moment de l'alliberació del bloqueig en G1/S (figura 62C), demostrant així que el tractament amb CHX no interfereix en l'activació del *checkpoint* de fase S.

Per universalitzar que l'acumulació de la ciclina E2 de forma dependent del *checkpoint* requereix de la síntesi de novo de la proteïna, tot i que aquest procés no és suficient, es va repetir l'experiment utilitzant la línia cel·lular HEK293T.

Els resultats de WB contra ciclina E2 confirmaren la observació realitzada en cultius de cèl·lules HeLa, és a dir, que quan s'inhibeix la traducció en condicions d'estrès replicatiu es produeix un descens en els nivells de la ciclina E2 (figura 63B). Tot i això, hi ha un pool de ciclina E2 que es manté al menys 2 hores més i, a més, aquest no es redueix un 50% durant cada 30 minuts, confirmant que ha d'haver-hi un altre mecanisme controlat pel *checkpoint* de fase S ajudant a l'acumulació de la proteïna.

Novament fou confirmada l'activació del *checkpoint* de fase S mitjançant un WB contra la forma activa de CHK1 com s'observa a la figura 63B.

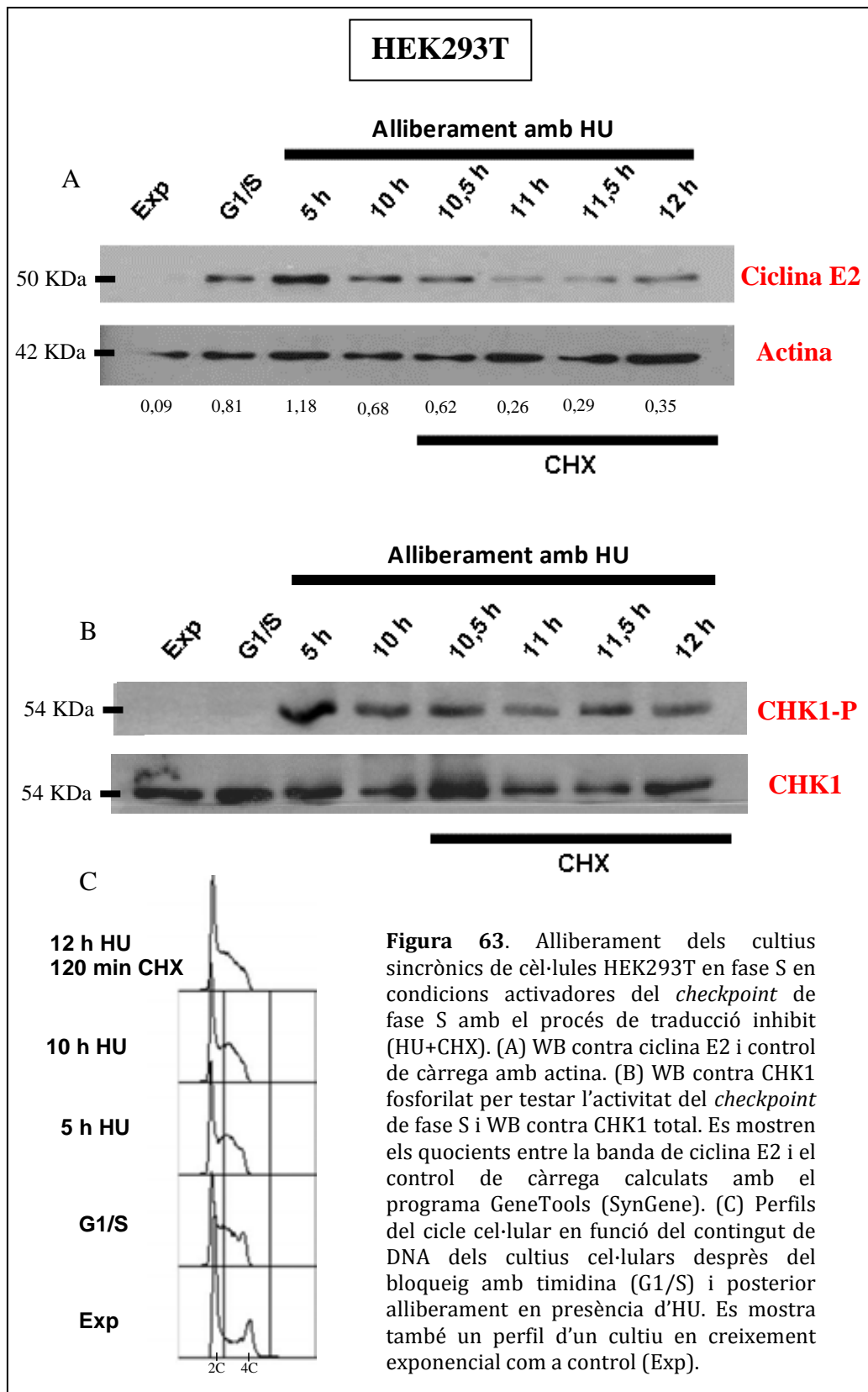
Per últim es confirmà per FACS l'enriquiment en la transició G1/S dels cultius de HEK293T després del tractament amb timidina i el posterior bloqueig per depleció dels dNTP en fase S (veure figura 63C).

Per tant, amb aquests resultats podem confirmar que l'activació del *checkpoint* de fase S produeix un augment dels nivells de mRNA de la ciclina E2 necessaris per a que la proteïna s'acumuli induïda per la síntesi *de novo*, tot i això no podem descartar que el mecanisme de manteniment de la integritat genòmica estigui actuant addicionalment sobre la ciclina E2 a un altre nivell.

2.5.6 Efecte de l'acumulació de la ciclina E2

Per estudiar l'efecte de l'acumulació de la ciclina E2 per activació del *checkpoint* de fase S en resposta a estrès replicatiu, es va mimetitzar el fenomen sobreexpressant de forma ectòpica i transitòria la ciclina E2 en cultius de cèl·lules HeLa.

S'obtingué la construcció del cDNA de la ciclina E2 en el vector lentiviral pLENTI4/v5-DEST sota el control d'un promotor d'expressió constitutiva. El vector es transfectà a partir del reactiu comercial Lipofectamina 2000 (Invitrogen) seguint les indicacions del fabricant.

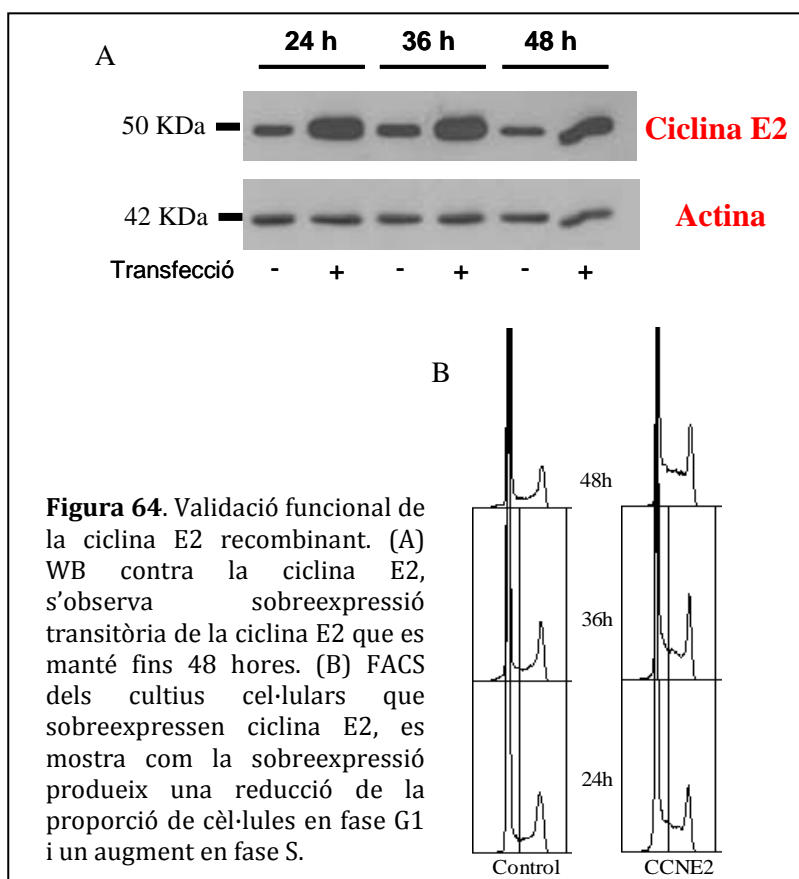


Es recolliren mostres després de 24, 36 i 48 hores des de la transfecció amb l'objectiu de confirmar per WB la sobreexpressió de la ciclina E2 i de fer un estudi de citometria per avaluar la progressió al llarg del cicle cel·lular.

A la figura 64A es mostra el WB anti-ciclina E2, on es pot apreciar que hi ha una clara acumulació de la ciclina en les mostres transfectades que s'allarga durant les 48 hores.

Els perfils obtinguts per FACS (figura 64B) demostren un increment progressiu de cèl·lules en fase S, que es fa més evident a les 48 hores, moment en què les cèl·lules dels cultius han pogut completar dos cicles cel·lulars.

Aquests resultats indiquen que l'acumulació de la ciclina E2 provoca defectes en la progressió al llarg de la fase S, per tant l'acumulació de la ciclina dependent del *checkpoint* pot estar col·laborant en el bloqueig del cicle cel·lular.



**ESTUDI DEL PAPER DE LA CICLINA E2 EN LA RESPOSTA A
LA CAMPTOTECINA**

La ciclina E2 s'ha trobat sobreexpressada en un elevat número de tumors primaris. Com en el present estudi s'ha demostrat que és una diana transcripcional del *checkpoint* de fase S, s'ha hipotetitzat que els seus alts nivells poden conferir resistència enfront a l'acció de determinats agents quimioteràpics.

Els tractaments quimioteràpics utilitzats en clínica es basen en un balanç entre l'efecte beneficiós que la droga aporta al pacient i els efectes secundaris no desitjats. Desafortunadament, en un elevat número de casos el pacient no respon com s'espera al tractament, no obstant pateix els efectes tòxics derivats de la teràpia. La disponibilitat de marcadors moleculars que permetin la predicció de resposta d'un pacient a una determinada teràpia evitaran en gran mesura aquest tipus de situacions, constituint un avanç molt significatiu cap a una teràpia personalitzada del càncer.

La sobreexpressió de la ciclina E2 pot conferir una major capacitat de reparació en les cèl·lules tumorals enfront aquells agents que lesionen directament el DNA o que pertorben el procés de la replicació. El interès del nostre grup es centra en l'estudi del càncer colorrectal, per aquest motiu es va decidir estudiar la resposta a la camptotecina (CPT), ja que a demostrat ser molt eficaç en el tractament d'aquests tumors, ja que produeix tant lesions directament sobre el DNA com estrès replicatiu.

La CPT és un inhibidor de la topoisomerasa I, ja que forma complexos estables amb el propi enzim i les cadenes de DNA; així la molècula de DNA no es pot relaxar del seu alt grau d'enrotllament per ser replicada i transcrita, generant senyals que activen la via d'ATR. Quan la maquinària replicativa o transcripcional xoquen contra aquests complexos produeixen trencaments de doble cadena que també activen la via d'ATM.

Resultats obtinguts al nostre laboratori utilitzant *C. elegans* com a model experimental, mostraren que la inhibició de l'expressió de la ciclina E provoca una elevada sensibilitat al tractament amb CPT (Aristizabal-Corrales, 2009). En aquest estudi, es va procedir a la inhibició amb un RNAi específic per a l'ortòleg de la ciclina E (*cye-1*) en larves de cuc en fase inicial en presència o absència de CPT. Es va mesurar la viabilitat dels cucs, entenent-la com el número de larves que arriben a fase adulta i a més, són capaces de generar descendència. Es va veure que en presència de CPT les larves sense *cye-1* arribaven a un estadiatge adult, però totes elles eren estèrils, efecte que no succeïa en absència de CPT on les larves presentaven una viabilitat del 80% en relació a les larves salvatges. D'aquesta manera es demostrà l'efecte tòxic del quimioteràpic en les gònades del cuc que és l'únic òrgan que presenta cohorts cel·lulars en divisió.

Donats aquests resultats, ens plantejarem realitzar un estudi *in vitro* per avaluar el paper de la resposta de la sobreexpressió de la ciclina E2 enfront el tractament amb CPT. S'utilitzà un model de cèl·lules HeLa transfectades establement amb el gen *CCNE2* sota el control d'un promotor constitutiu i es procedí a la realització d'assaigs de viabilitat cel·lular.

3.1 Clonatge de *CCNE2* en el vector d'expressió pLENTI4/V5-DEST

S'obtingué el cDNA de la ciclina E2 en el vector de clonació pENTR221 (Invitrogen). Utilitzant el sistema *Gateway® Cloning* (Invitrogen) el cDNA es transferí al vector lentiviral d'expressió pLENTI4/V5-DEST (veure Materials i Mètodes 2.6). El producte de la recombinació s'utilitzà per transformar *E. coli* Stbl3. A partir dels clons capaços de créixer en ampicil·lina es realitzaren extraccions de DNA plasmídic en STET per recuperar la construcció (veure Materials i Mètodes 3.3).

La clonació va ser confirmada digerint el producte de l'extracció de DNA plasmídic amb l'endonucleasa *KpnI* que talla una única vegada en la seqüència del vector i una altra dins la seqüència de l'insert. El patró de restricció fou comprovat en un gel d'agarosa 0,8% com es mostra a la figura 65.

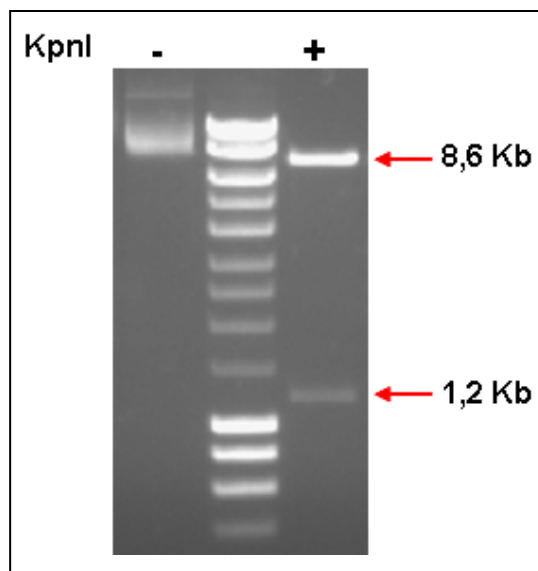


Figura 65. Resultat de la comprovació de la digestió del vector pLENTI4/V5-DEST-*CCNE2*. En el primer carril s'observa el vector sense tallar. El segon correspon al marcador de pes molecular i el tercer el vector digerit amb l'enzim de restricció *KpnI*. En aquest últim carril s'observen dues bandes, una de 8,6 Kb i l'altra de 1,2 Kb.

El vector digerit amb *KpnI* va generar dues bandes de 8,6 i 1,2 Kb compatibles amb les que teòricament s'esperaven, confirmant d'aquesta manera la clonació de l'insert i la correcta direccionalitat.

3.2 Obtenció de cèl·lules HeLa que sobreexpressen de forma estable ciclina E2

3.2.1 Producció dels lentivirus

Per produir cèl·lules HeLa que sobreexpressessin establement la ciclina E2 s'utilitzà el sistema de transducció lentiviral, ja que s'obté un millor rendiment i facilitat la integració de la construcció dins el genoma cel·lular.

El primer pas fou obtenir els lentivirus que continguessin el vector pLENTI4/V5-DEST-*CCNE2*. En un cultiu de HEK293FT es co-transfectà amb lipofectamina 2000 els vectors que contenen els gens que codifiquen per la càpside vírica pLP1, pLP2 i pLP/VSVG i, pLENTI4/V5-DEST-*CCNE2* o pLENTI4/V5-DEST-LacZ, com a control negatiu (veure Materials i Mètodes 2.9.1).

La línia HEK293FT deriva de les cèl·lules HEK293F que són de creixement ràpid. A més, sobreexpressa l'antigen T del virus SV40, que permet mantenir durant més temps els vectors co-transfectats (si presenten un origen de replicació del virus SV40), d'aquesta manera ens assegurarem una major producció de lentivirus (Naldini et al., 1996).

El medi de cultiu amb els lentivirus es recollí a les 48 i 72 hores de la transfecció.

3.2.2 Transducció de les cèl·lules HeLa i selecció dels clons positius

S'infectaren dos cultius de cèl·lules HeLa, un amb lentivirus que portaven la construcció pLENTI4/V5-DEST-*CCNE2* i l'altre amb els que portaven la construcció control pLENTI4/V5-DEST-LacZ. Després de 24 hores, els cultius es diluïren per obtenir clons individuals aïllats i es seleccionaren tractant-los amb zeozina.

S'obtingueren 21 clons transduïts amb pLENTI4/V5-DEST-*CCNE2* i 10 clons resistents a zeocina portadors del gen LacZ com a control negatiu.

3.2.3 Comprovació dels clons transduïts amb pLENTI4/V5-DEST-*CCNE2*

Per seleccionar els clons que sobreexpressaven la ciclina E2 es va fer un WB contra aquesta proteïna (figura 66). 13 clons presentaven nivells endògens per a la ciclina E2, mentre que 8 presentaven nivells superiors, és a dir, que sobreexpressaven la proteïna. Això indica que el rendiment del procés va ser més baixa del que s'esperava amb una eficiència propera al 40%.

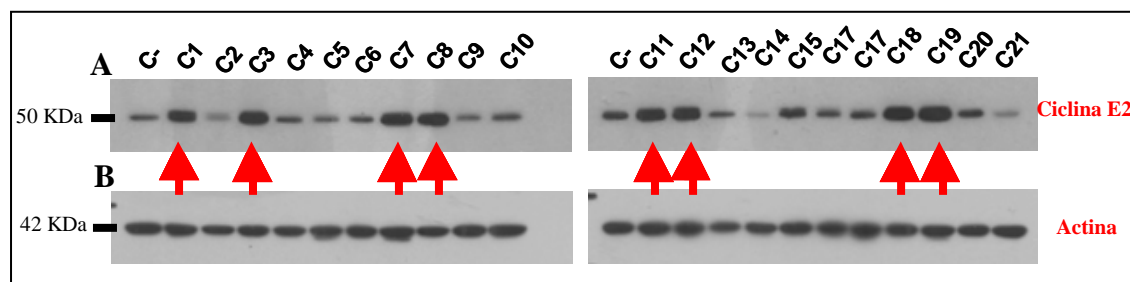


Figura 66. Comprovació dels clons transduïts amb pLENTI4/V5-DEST-CCNE2. **A)** WB contra la ciclina E2. **B)** WB contra actina. C- correspon a un extracte d'un cultiu de cèl·lules HeLa parental, C1-C21 extractes dels clons obtinguts.

3.3 Assaig de viabilitat cel·lular (MTT)

Per avaluar si la sobreexpressió de ciclina E2 provocava diferències en la resposta al tractament amb inhibidors de topoisomerasa I, es va realitzar un assaig de viabilitat utilitzant 7 concentracions de CPT (0,001; 0,0025; 0,01; 0,025; 0,25; 1 i 2,5 μ M) (veure Materials i Mètodes 2.10). Després de tres dies d'incubació, es calculà la viabilitat cel·lular envers cada concentració de CPT a partir de la tinció amb el colorant bromur de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolil (MTT) (veure materials i Mètodes 2.10).

S'utilitzaren 2 clons resistents a zeocina (transduïts amb el vector pLENTI4/V5-DEST-LacZ) com a control negatiu i 2 clons independents que sobreexpressaren la ciclina E2. Els assaigs es van fer en tres experiments independents.

Les dades foren ajustades a una corba de regressió no lineal dosi-inhibició per obtenir les corbes de viabilitat cel·lular. En tots els casos es calculà el valor R^2 que indica el grau d'ajust de la corba als punts, aquest paràmetre va de 0-1, quan més alt sigui indica que el model s'ajusta millor a les dades. En tots els casos fou superior al 0,9. Interpolant el 50% de viabilitat s'obtingué el valor del IC50 de cada clon.

En les corbes de supervivència (figura 67A) s'aprecia que els clons que sobreexpressen ciclina E2 (C8 i C19) presenten una major resistència al tractament amb CPT respecte els controls (LacZ C3 i C6), ja que estan desplaçades cap a la dreta.

Pel que fa a l'estimació de l'IC50 (figura 67 B), s'observa com els clons C8 i C19 presenten valors amb una mitjana més gran de dos vegades amb els controls. Es va aplicar un test T d'*Student* comparant els resultats dels clons amb elevats nivells de ciclina E2 envers els controls negatius, en tots els casos s'apreciaren diferències significatives. Confirmant així,

que *in vitro* la sobreexpressió de ciclina E2 confereix una major resistència a la quimioteràpia basada en inhibidors de topoisomerasa I.

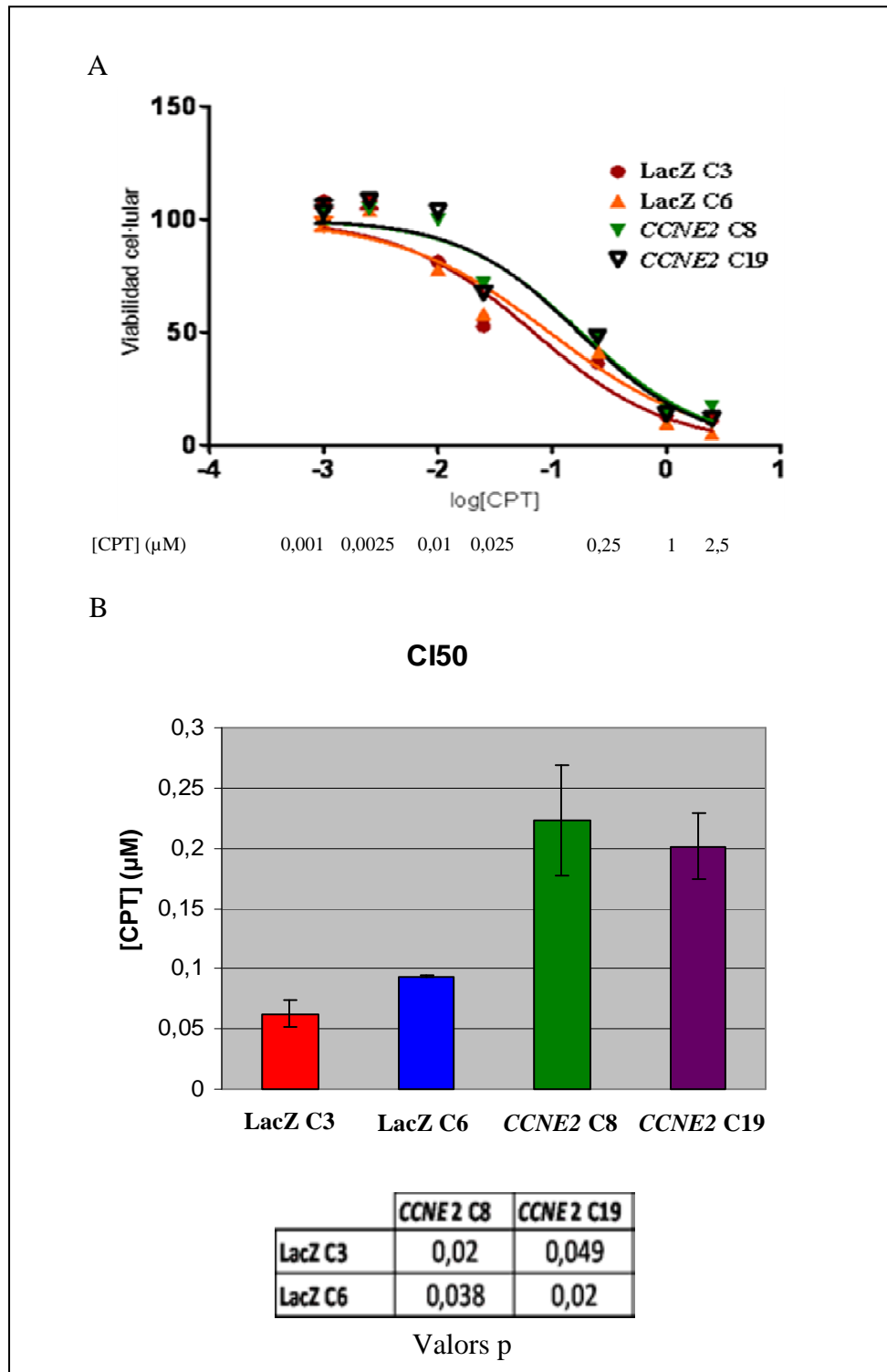


Figura 67. Efecte de la sobreexpressió de ciclina E2 en cèl·lules HeLa en la resposta a CPT. (A) Corbes de viabilitat dosi-resposta d'una rèplica representativa. (B) IC50 de CPT dels clons seleccionats. A sota es mostren els valors p entre els clons.

Discussió

“Quan arribis al final del camí, veuràs que sempre has estat allà. Quan t’alliberis, sabràs que sempre has estat lliure”

Khalil Gibran (Poeta)

1. Identificació de noves dianes del *checkpoint* de fase S a través de 2D-DIGE en *S. Cerevisiae*

En aquest treball s'ha posat a punt un mètode per la identificació de dianes del mecanisme de vigilància de la integritat genòmica a gran escala mitjançant la tècnica bioquímica 2D-DIGE en resposta a estrès replicatiu. Aquesta tècnica es basa en la comparació de proteomes marcats amb fluorocroms diferencials i resolts en un únic gel bidimensional.

Per simplificar el sistema es decidí utilitzar *S. cerevisiae* com a model experimental, ja que presenta un proteoma més reduït i, per tant, més fàcil de resoldre que l'humà. A més, permet treballar amb cèl·lules haploides que presenten una elevada taxa de recombinació homòloga, facilitant la manipulació gènica.

A través de la tècnica 2D-DIGE s'han comparat els proteomes d'una soca salvatge pel *checkpoint* de fase S i una soca deficient per la deleció del transductor central *MEC1* en condicions generadores d'estrès replicatiu.

S'han tingut una sèrie de precaucions en el disseny experimental per assegurar que els canvis observats siguin deguts exclusivament a la presència o absència de resposta. En primer lloc, donat que Mec1p té una funció essencial com a regulador de Sml1p, independent de la seva funció en el *checkpoint* de fase S, s'ha treballat en un fons isogènic *sml1Δ*. En segon lloc, s'han obtingut cultius sincrònics, de manera que la pràctica totalitat de les cèl·lules es troben en crisi replicativa al començament de la fase S en presència d'HU, i les diferències observades no són degudes a la contribució proteòmica de cèl·lules en altres fases del cicle cel·lular.

La tècnica 2D-DIGE ens va permetre visualitzar aquestes diferències. Aquesta tècnica és una modificació dels sistemes de 2D tradicionals que presenta una sèrie de fortaleses, permetent detectar canvis per inducció, destrucció, acumulació i modificacions post-traduccionals en proteïnes dependents de l'activació o no del *checkpoint* de fase S.

En especial, el fet de carregar les mostres a comparar en un únic gel bidimensional permet reduir la variabilitat experimental de la seva migració que es produeix analitzant dos gels independents i per tant, facilitant la comparació de cada punt.

Les proteïnes presents en aquests punts s'han identificat mitjançant espectroscòpia de masses.

L'anàlisi per 2D-DIGE aporta informació preliminar que serveix com a punt de partida per portar a terme posteriors estudis moleculars més detallats. Els candidats considerats més

interessants s'han de validar amb experiments individuals per confirmar si realment experimenten canvis en resposta a l'activació del *checkpoint* de fase S: si els seus nivells augmenten (per inducció o per estabilització), o disminueixen (per repressió o per destrucció a través del sistema ubiquitina ligasa-proteasoma), o per modificacions post-traduccionals (principalment fosforilació o desfosforilació).

De les proteïnes identificades per espectroscopia de masses dels punts diferencials de l'anàlisi 2D-DIGE, s'ha de destacar que no s'aconseguí identificar cap proteïna implicada prèviament en la resposta del *checkpoint* de fase S. Això indica que probablement tampoc no hem pogut detectar d'altres dianes interessants de la ruta molecular. Tot i les reduïdes dimensions del proteoma del llevat de gemmació, comparat amb l'humà, la capacitat resolutiva dels gels bidimensionals no ha permès la seva completa separació. Possiblement diferències de fluorescència en un punt han quedat emmascarades per l'encavalcament de proteïnes més abundants que no experimenten canvis. Per això hem plantejat una sèrie d'estratègies per optimitzar aquesta aproximació en el futur:

- Purificació de fosfoproteïnes mitjançant columnes IMAC (*immobilized metal affinity chromatography*). Aquestes columnes contenen una matriu formada per ferro que es capaç d'unir les proteïnes fosforilades dels extractes, reduint les dimensions del proteoma a les del fosfoproteoma (Seidler et al., 2010; Sickmann and Meyer, 2001).
- Fraccionament bioquímic mitjançant talls de sulfat d'amoni i anàlisi de les diferents fraccions proteòmiques.
- Fraccionament del 2D-DIGE. Es prepararien diferents gels bidimensionals per cada parella d'extractes proteics a comparar, variant les condicions de primera i segona dimensió. Per la primera dimensió, utilitzant tires de pH àcid (3-6) i de pH alcalí (7-10 NL) en comptes d'una sola de pH 3-10 com en el treball actual. Cadascuna d'aquestes dues primeres dimensions s'acoblaria a dues segones dimensions diferents. En un cas s'utilitzarien gels d'alta densitat (15%, optimitzant l'anàlisi de proteïnes petites) i en l'altre de baixa densitat (7.5%, optimitzant l'anàlisi de proteïnes grans), en comptes d'una sola densitat (12.5%) com en el present estudi.

Tot i això, dels 19 punts diferencials obtinguts, s'identificaren 13 proteïnes per espectroscopia de masses. Entre elles, un grup corresponen a proteïnes involucrades en el metabolisme de sucres (G3P deshidrogenasa, Lactat deshidrogenasa, glucoquinasa, enolases

1 i 2, Mg aldehyd deshidrogenasa, Dihidrolipoamida deshidrogenasa), una proteïna implicada en la traducció (40 S), així com una implicada en el transport cel·lular de reticle endoplasmàtic a l'aparell de Golgi (Sec3p). Tot i que no es pot descartar que es tractin de falsos positius, degut a que són proteïnes molt abundants en les cèl·lules, és raonable esperar que la cèl·lula ajusti el seu metabolisme, síntesi proteica i transport en resposta a estrès replicatiu per adaptar-se a situacions d'estrès.

Altres dos proteïnes identificades van ser Smc2p i Scp160p. Degut a què aquestes dues proteïnes estan implicades en processos del cicle cel·lular, que era l'interès del nostre estudi, van ser seleccionades per ser validades individualment com a dianes de la resposta del *checkpoint* de fase S.

1.1 Smc2p

Smc2p és una proteïna essencial, forma part del complex condensina que actua condensant els cromosomes. Precisament, un dels defectes que es produeixen quan el *checkpoint* de fase S és incapaç de respondre davant condicions d'estrès replicatiu és la condensació prematura de la cromatina en cromosomes parcialment replicats (Nghiem et al., 2001), conduint a mort cel·lular o generant inestabilitat genòmica. Smc2p és una bona candidata a ser diana de la resposta del *checkpoint* per evitar l'acció del rellotge del cicle cel·lular condensant indegudament cromosomes incompletament replicats.

Smc2p junt a Smc4p formen el nucli central del complex condensina, les dues proteïnes quan heterodimeritzen presenten activitat ATPasa que permet compactar el DNA (Hirano and Mitchison, 1994; Saitoh et al., 1994; Saka et al., 1994; Strunnikov et al., 1995). Les altres proteïnes que formen el complex són les anomenades no-SMC, que corresponen a tres subunitats amb funcions reguladores. En *S. cerevisiae* existeix un únic complex condensina, les subunitats reguladores del qual són Ycs4p, Ycs5p, Brn1p (Lavoie et al., 2002). En vertebrats superiors existeixen dos complexos, l'I (Hirano et al., 1997) i el II (Ono et al., 2003), tots dos són formats pel nucli SMC2/SMC4 i difereixen per les subunitats reguladores (CAP-D2, CAP-G i CAP-H en el complex I i CAP-D3, CAP-G2 i CAP-H2 en el complex II). La condensina de *S. cerevisiae* és sempre nuclear, suggerint funcions reguladores en interfase. La condensació mitòtica dels cromosomes comença en la profase (Freeman et al., 2000).

En vertebrats superiors la condensina II és sempre nuclear i comença a condensar els cromosomes en profase, mentre que la condensina I és citoplasmàtica i només accedeix als cromosomes quan l'embolcall cel·lular es desfà a la prometafase, així els dos complexos condensina col·laboren en la condensació final (Hirota et al., 2004; Ono et al., 2004). Els

nivells de les subunitats dels dos complexos es mantenen constants al llarg de tot el cicle cel·lular (Ono et al., 2004; Takemoto et al., 2004).

En els nostres estudis, Smc2p no s'ha pogut confirmar com a diana del mecanisme de vigilància de la integritat genòmica, ja que no s'han trobat diferències entre la soca salvatge i la deficient en el mecanisme en condicions d'estrès replicatiu. Per WB no hem vist que es produeixi acumulació, descens o variacions en la migració electroforètica de la proteïna que indiqui canvis post-traduccionals (figura 37). Precipitant la proteïna a partir d'extractes totals de les dues soques en condicions activadores de la ruta es va avaluar la possible fosforilació a partir de WB amb un anticòs contra residus fosforilats inespecífics, tampoc es va detectar cap banda específica compatible amb Smc2p (figura 38). El problema d'utilitzar aquest anticòs és que no es disposa de cap control directe pel mateix, ja que no està descrita cap fosforilació de la proteïna al llarg del cicle cel·lular (Takemoto et al., 2004), a més es considerarà que la utilització d'una altra fosfoproteïna no hagués estat un bon control perquè la eficàcia d'unió de l'anticòs depèn del residu fosforilat i dels aminoàcids del voltant.

El complex condensina és altament conservat al llarg de l'escala evolutiva, en *S. Pombe* s'ha reportat que una mutació termosensible per Cdn2 (Brn1p i CAP-H en llevat de gemmació i humà, respectivament) fa que les cèl·lules no presentin una resposta correcta del *checkpoint*, postulant que podria ser diana del mateix (Aono et al., 2002). Per altra banda, en un estudi a gran escala es va trobar que CAP-D2 es fosforila dependent de l'activació del mecanisme de manteniment de la integritat genètica, tot i que no ha estat validada ni avaluada la seva funció (Matsuoka et al., 2007). De totes maneres, a pesar que els nostres resultats no han estat conclouents i que hi ha informacions que indiquen que el complex condensina estaria controlat pel *checkpoint* de fase S a través de les subunitats reguladores, no es pot descartar que la regulació del complex sigui redundat, és a dir, que diferents subunitats siguin regulades en resposta a estrès replicatiu i, per tant que Smc2p estigui implicada. La regulació de Smc2p pel *checkpoint* de fase S permetria, en vertebrats superiors, regular els dos complexos condensina en resposta a dany en el DNA. La nostra hipòtesi és que si Smc2p es fosforila de forma dependent del mecanisme de supervivència ajudaria en el bloqueig de la progressió en el cicle cel·lular, inhibint activament la condensació de cromosomes parcialment replicats.

Per confirmar-ho es proposa fer experiments centrats en estudiar la possible fosforilació de la proteïna dependent del *checkpoint* de fase S, a partir de diferents tècniques com assaigs quinasa *in vitro* amb la proteïna transductora de la via Mec1p i la seva quinasa efectora Rad53p, utilitzar gels per tinció de fosfoproteïnes *Pro-Q Diamond* (Invitrogen) o estudi dels dominis putativament fosforilables de Smc2p per espectrometria de masses.

1.2 Scp160p

Scp160p, és un altre candidat interessant obtingut a partir del 2D-DIGE. Pertany a la superfamília de les vigilines que es caracteritzen perquè presenten dominis multi-KH que són altament conservats al llarg de l'evolució (Cortes et al., 1999; Weber et al., 1997). Aquest domini s'associa a la interacció amb poliribosomes i amb mRNA (Frey et al., 2001; Lang et al., 2001), participant en el metabolisme del RNA (Cortes et al., 1999; Dodson and Shapiro, 1997; Li et al., 2003; Plenz et al., 1994; Schmidt et al., 1992; Weber et al., 1997; Wintersberger et al., 1995). S'ha demostrat que tant Scp60p com els seus ortòlegs en altres espècies, interaccionen amb transcrits concrets, per tant, les vigilines participen activament en el control de l'expressió de gens concrets (Li et al., 2003). Hi han evidències que indiquen que aquesta família de proteïnes en *Drosophila* i mamífers contribueixen a l'organització estructural de l'heterocromatina. En el llevat de gemmació s'ha vist que Scp160p contribueix al silenciament de les regions telomèriques, a través d'un mecanisme independent de la interacció amb els ribosomes (Marsellach et al., 2006).

Des del punt del control de cicle cel·lular la funció més interessant de Scp160p, tot i que no es coneix el mecanisme, és que pot estar implicada en la replicació o en la segregació de cromosomes, ja que la deleció del gen dona lloc a l'aparició de poliploïdies (Wintersberger et al., 1995). S'ha vist que mutacions en l'ortòleg de *Drosophila*, *ddp1*, produeixen defectes en la condensació i segregació de les cromàtides germanes durant la mitosi (Huertas et al., 2004; Wang et al., 2005).

Es comparà el comportament de Scp160p en condicions d'estrès replicatiu entre una soca salvatge i una soca deficient en la resposta del *checkpoint* de fase S a través de WB. Curiosament, en condicions d'estrès replicatiu es va observar l'aparició d'una banda de major mida en totes dues soques compatible amb un canvi post-traducciona (figura 42). Com aquesta forma era present en totes dues soques indicava que era independent de l'activació de Mec1p.

Aquesta banda podia ser deguda a què Scp160p sigui una proteïna que presenta una expressió diferencial en el cicle cel·lular o perquè la deleció del transductor central Mec1p, fos compensada per l'activació de la proteïna quinasa transductora del *checkpoint* Tel1p, que en casos concrets pot desenvolupar aquesta funció (Clerici et al., 2004).

Per testar les diferents possibilitats, cultius de la soca parental W303-1a foren sincronitzats i alliberats en una fase S no pertorbada o en condicions d'estrès replicatiu; s'agafaren mostra cada vint minuts durant dues hores. En cap dels experiments es van apreciar canvis en la mobilitat ni en la intensitat de la banda. Com es mostra en un absència d'HU (figura 43)

no es produeix cap canvi al llarg del cicle cel·lular. De la mateixa forma, Scp160p tampoc varia en condicions d'estrès replicatiu com semblava prèviament (figura 44), descartant que ho fes per recuperació de funció a partir de l'activació de Tel1p o per efecte inespecífic de la HU. Per tant, el *checkpoint* de fase S no exerceix modificacions observables a través de WB en l'estat o quantitat de la proteïna. Com la banda de migració més lenta s'aprecia en les dues soques *sml1Δ* i no en la soca parental, salvatge pel gen, no es pot descartar que Sml1p tingui algun efecte sobre Scp160p en condicions d'estrès replicatiu.

De totes maneres amb els resultats obtinguts no es pot descartar que es puguin produir modificacions post-traduccionals que regulin la funció de Scp160p, com en el cas de Smc2p. Scp160p podria estar regulant la traducció de determinats missatgers, l'expressió de gens implicats en el control de la condensació i segregació de cromosomes, com ja s'ha comentat prèviament. L'activació del *checkpoint* podria inhibir la funció de Scp160p per ajudar el bloqueig de la progressió al llarg del cicle cel·lular. Per tant es proposa un estudi més acurat de la possible fosforilació de Scp160p dependent de l'activació de Rad53p a través de assaigs quinasa *in vitro*, estudi dels dominis putativament fosforilables a través d'espectrometria de masses o utilitzar gels per tinció de fosfoproteïnes *Pro-Q Diamond* (Invitrogen).

Degut a que no s'aconseguí confirmar com a dianes del mecanisme de supervivència de fase S els dos candidats seleccionats, i que no es van identificar més proteïnes relacionades amb el cicle cel·lular a partir de l'anàlisi 2D-DIGE, ens plantejarem canviar d'estratègia. Es va decidir cercar noves dianes transcripcionals de la resposta del *checkpoint* a partir de microxips d'expressió. En aquest cas s'utilitzà un model cel·lular humà, ja que es disposen de microxips comercials capaços d'analitzar tots els gens humans coneguts, així com d'altres seqüències transcrites.

2. Identificació de noves dianes del *checkpoint* de fase S a través de microxips d'expressió en cèl·lules HeLa

Es van comparar els transcriptomes de cultius de cèl·lules HeLa tractats en condicions activadores del *checkpoint* de fase S i cèl·lules no tractades per establir canvis d'expressió significatius. Per eliminar possibles falsos positius s'utilitzà com a segon control el transcriptoma de cultius de cèl·lules HeLa tractats amb HU i cafeïna per inhibir la quinasa efectora ATR, en aquest cas, les seqüències amb canvis d'expressió significativa entre els tractaments d'HU i control, havien de retornar a la seva expressió basal en el tractament combinat.

A partir dels microxips d'expressió s'han obtingut 137 seqüències que varien significativament la seva expressió entre el tractament amb HU i el control negatiu, que a més, segueixen una patró específic per l'activació del *checkpoint* de fase S. D'aquestes seqüències, 120 corresponien a gens ben caracteritzats.

Per fer una estimació funcional global dels resultats obtinguts a través dels microxips d'expressió, els 120 gens es van estudiar utilitzant el paquet informàtic *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) (figura 51). Aquesta aplicació ens va permetre establir categories funcionals significatives dels candidats en relació a les categories establertes en la base de dades de la plataforma, així s'assignaren les categories més representades d'implicacions en malalties humanes, funcions cel·lulars i rutes metabòliques.

En els processos cel·lulars més significativament representats destaquen molts d'ells que ja era coneguda la relació amb la resposta del *checkpoint* de fase S com la regulació de l'apoptosi, cicle cel·lular, creixement i proliferació cel·lular, control de la replicació, recombinació i de la reparació i metabolisme de fàrmacs. Aquests resultats ajuden a validar els microxips. Per contra, altres funcions enriquides són més sorprenents, on destaquen la mobilitat cel·lular, morfologia, interacció entre cèl·lules, transport... Indica que en situacions d'estrès la cèl·lula ha d'adaptar el seu metabolisme global per fer front a la nova situació.

Pel que fa a les rutes canòniques destaquen aquelles implicades en el cicle cel·lular i el seu control (*checkpoint* G1/S, *checkpoint* G2/M, ruta de les MAP quinases, control de la mitosi), així com les de resposta a dany en el DNA (Proteïnes relacionades amb les funcions de les quinases CHK, BRCA1) i diferents mecanismes de control d'apoptosi (p53, complex 14-3-3 i MYC). Aquests resultats novament estan validant els nostres resultats ja que són processos que comparteixen elements amb el *checkpoint* de fase S o que són dianes de la seva resposta. Per altra banda, es relacionà la implicació dels candidats amb malalties humanes on s'ha de destacar una àmplia representació de seqüències associades a processos tumorals. Ja ha estat àmpliament publicat que la desregulació de proteïnes implicades en la resposta del *checkpoint* de fase S genera inestabilitat genòmica i afavoreix la transformació maligna tumoral (Hartwell, 1992; Liu et al., 2010).

Un altre punt interessant, és que s'han obtingut candidats transcripcionals coneguts que responen a l'activació del *checkpoint* de fase S, com són CLSPN (Tsimaratou et al., 2007) i RRM1 (Filatov et al., 1996) que també ens ajuden a la validació dels resultats. RRM1 és la subunitat catalítica del complex enzimàtic RNR, és l'enzim encarregat de la conversió dels nucleòtids difosfats (NDP) a desoxinucleòtids difosfat (dNDP) intermediaris en la síntesi del DNA. La HU concretament inhibeix aquest complex enzimàtic impedit la síntesi *de novo* de

dNTP. Paral·lelament, també s'han obtingut seqüències que codifiquen per proteïnes que es fosforilen de forma dependent del mecanisme de supervivència de fase S: CLSPN (Kumagai and Dunphy, 2000) i p53 (Shieh et al., 2000; Shieh et al., 1999; Shiloh, 2001) o proteïnes que en estudis a gran escala s'han reportat com a candidats a ser dianes putatives de fosforilació: FIGNL1 (proteïna que pot estar implicada en la diferenciació cel·lular), HSPA4 (proteïna que possiblement actua com a xaperona), METT10D (putativa metiltransferasa), PLEC1 (actua com a enllaç entre diferents elements del citoesquelet), RBM14 (actua com un regulador transcripcional), RFC3 (forma part del complex RAD17-RFC, col·laborant en la senyalització i activació de la via d'ATR en resposta a estrès genotòxic), VAMP3 (proteïna present en la membrana de vesícules que intervé en el procés de fusió), ZMYND11 (és un repressor transcripcional) (Matsuoka et al., 2007), HSP90AB1 (xaperona que ajuda al plegament de proteïnes després d'una situació d'estrès), PIK3C2A (proteïna relacionada en la senyalització de la progressió cel·lular, supervivència, migració i tràfic intracel·lular), NUMA1 (proteïna nuclear relacionada amb la formació de l'ús mitòtic) i MSH6 (proteïna de reparació del DNA que actua en el reconeixement de parells de bases mal aparellats) (Matsuoka et al., 2007; Stokes et al., 2007). Si aquests resultats es confirmessin indicaran que el *checkpoint* de fase S pot estar reforçant la seva resposta immediata (produïda per cascades de fosforilació) transcrivint proteïnes diana.

Per confirmar els resultats empíricament s'ha comprovat l'expressió de 14 d'aquestes seqüències sota les mateixes condicions que es realitzaren els microxips per PCR a temps real. 11 de les quals ratificaven les observacions efectuades en els microxips, mentre que 3 seqüències van mostrar ser falsos positius. Això indica que els resultats dels microxips presenten una especificitat aproximada d'un 78,5%.

2.1 El mecanisme de manteniment de la integritat genòmica estabilitza la ciclina E2 en resposta a estrès replicatiu

Es va decidir la validació individual de la ciclina E2 degut a quatre raons:

- És una proteïna involucrada en el control i la progressió del cicle cel·lular,
- Està àmpliament reportada la seva sobreexpressió en tumors primaris humans,
- Si la confirmàvem com a diana transcripcional induïda pel *checkpoint* de fase S, combinat que està sobreexpressada en tumors primaris, entre ells destacant el càncer colorrectal (centre de l'estudi del nostre laboratori), podria estar modulant la resposta quimioteràpica a inhibidors de topoisomerasa I.

- Recentment, hem demostrat que l'ortòleg funcional en el llevat de gemmació, Clb6p, és diana transcripcional de la ruta molecular (Palou et al., 2010).

La ciclina E2 és una de les seqüències identificades com a diana transcripcional del *checkpoint* de fase S a partir dels microxips d'expressió *Human Genome U133 Plus 2.0*. L'expressió de la ciclina E2 augmenta 4,7 vegades en condicions d'estrès replicatiu en relació al control negatiu, d'aquesta manera estava dintre dels 10 millors candidats.

Per altra banda, en el tractament combinat d'HU i cafeïna l'expressió de la ciclina E2 disminueix fins situar-se entre els nivells induïts pel tractament amb HU i el control negatiu, seguint el patró específic d'activació pel *checkpoint* (taula 10). En una situació ideal l'expressió amb el tractament combinat hauria d'haver estat igual a la del cultiu control, no obstant la HU presenta una eficiència d'acció major que la cafeïna, ja sigui perquè difon millor a través de la membrana cel·lular o perquè la seva acció és més immediata, confirmada en les observacions realitzades en els WB anti-CHK1 fosforilat al llarg de tot el treball. A més, la cafeïna ha mostrat ser un inhibidor no específic de les quinases transductores centrals ATR i ATM, ja que s'ha reportat que pot inhibir altres quinases cel·lulars com les activadores del sistema *decay* (sistema que detecta i degrada missatgers amb codons STOP prematurs originats per mutació) (Ivanov et al., 2007) o la proteïna quinasa C (Ravi et al., 2008). Aquest fet afegit a què pot influir en altres enzims cel·lulars com la fosfodiesterasa de l'AMP cíclic (Vaugeois, 2002) fa que la cafeïna pugui afectar d'una manera directa o indirecta a l'expressió gènica i l'acció d'altres processos cel·lulars. Per tant, es creu que serà més efectiva la utilització d'inhibidors específics de les quinases del *checkpoint* de fase S en el futur, com poden ser la wortmanina que inhibeix tant ATR com ATM (Sarkaria et al., 1998) o l'UCN-01 que actua contra les quinases efectores CHK1 i CHK2 (Jackson et al., 2000).

Les observacions del microxip van ser confirmades a través de l'estudi dels nivells de mRNA de la ciclina E2 mitjançant PCR a temps real (figura 53), on s'observa que en condicions d'estrès replicatiu augmenta 3 vegades respecte el control i segueix el patró específic d'activació pel *checkpoint* de fase S.

Pel que fa al comportament de la ciclina E2 al llarg del cicle cel·lular, s'ha pogut confirmar que en un cicle no pertorbat es comença a acumular durant la fase G1, produint-se una acumulació màxima a la transició G1/S, moment en què junt a la seva parella funcional, CDK2, acaben de fosforilar als membres de la família del retinoblastoma fent que perden afinitat pels factors de transició de la família E2F que esdevenen actius. Un cop els cultius cel·lulars entren sincrònicament fase S, la quantitat de ciclina E2 va minvant fins que el

procés de la replicació acaba completament i la proteïna desapareix. Aquests resultats reafirmen observacions prèvies (Gudas et al., 1999; Lauper et al., 1998; Parrilla-Castellar et al., 2004; Zariwala et al., 1998). Contràriament en *Saccharomyces cerevisiae*, l'ortòleg de la ciclina E, CLB6, desapareix a la meitat de la fase S (Palou et al., 2010). Els nostres resultats originals mostren que, en presència d'estrès replicatiu, la ciclina E2 perdura més enllà de la seva finestra de temps, 8 hores després d'haver començat la fase S, produint una acumulació de proteïna màxima equiparable als nivells detectats a la transició G1/S. A més, aquesta estabilització és dependent de l'activació del *checkpoint* de fase S ja que, com hem demostrat, encara que hi hagin condicions d'estrès replicatiu si el mecanisme de vigilància de la fase S és inhibit, la ciclina E2 no s'acumula i es comporta com en una fase S no pertorbada, tot i que les cèl·lules no hagin pogut replicat el seu genoma.

Adicionalment, l'estabilització de la ciclina E2 en condicions d'estrès replicatiu i dependent del *checkpoint* de fase S s'ha confirmat també en cèl·lules HEK293T, aquest fet demostra que el fenomen es produeix de forma general en les cèl·lules humanes.

2.2 L'estabilització de la ciclina E2 requereix síntesi *de novo*, però no és suficient

Els resultats dels microxips i la PCR a temps real indiquen un augment del mRNA de la ciclina E2. Paral·lelament, els experiments en què s'inhibeix la síntesi proteica amb CHX en condicions d'estrès replicatiu, s'observa que l'acumulació de ciclina E2 decau dràsticament després de 30 minuts d'afegir l'inhibidor, desapareixent quasi completament després de 2 hores. Això indica que és necessària la síntesi proteica *de novo* per mantenir els elevats nivells de la proteïna.

La transcripció de les ciclines E, es dona bàsicament durant la fase G1 sota el control del factor de transcripció E2F1, essent inactivat progressivament al llarg de la fase S (DeGregori et al., 1995). Recentment s'ha reportat que l'activació del *checkpoint* de fase S per diferents tipus de lesions provoca la fosforilació i acumulació del factor de transcripció E2F1, aquest fet provoca la reactivació de la proteïna que promou la transcripció de proteïnes diana (Carcagno et al., 2009). Paral·lelament s'ha demostrat el mateix efecte en l'ortòleg de *S. cerevisiae*, MBF, on la seva subunitat Swi6p es fosforilada a través de la quinasa efectora Rad53p produint la seva reactivació en una fase S compromesa (Palou et al., 2010).

De totes maneres no es pot descartar que el *checkpoint* de fase S també actuï estabilitzant el mRNA de la ciclina E2 a través d'un factor desconegut.

Tot i això, i tenint en compte que la vida mitja de la ciclina E2 és de 30 minuts (Zariwala et al., 1998) i que s'observa una estabilitat dels nivells de proteïna encara que s'hagi inhibit la traducció que duren aproximadament 1h 30 minuts, cal pensar que la resposta del *checkpoint* actua a d'altres nivells que no impliquen la presència del mRNA.

El *checkpoint* de fase S podria estar estabilitzant la proteïna, per un costat pot realitzar-ho directament per modificacions post-traduccionals, probablement per fosforilació. En els últims anys s'ha descrit una fosforilació directa de la ciclina E1 en resposta a dany al DNA per l'acció d'ATM/ATR, tot i que no ha estat demostrada la seva funció (Matsuoka et al., 2007). Aquesta fosforilació podria estar ajudant a la seva estabilització, per tant es pot fer la hipotetitzar que la ciclina E2 també podria estar regulada per fosforilació directa. Hem confirmat que la ciclina E2 presenta en la seva seqüència dominis que podrien ser fosforilables per les quinases transductores centrals del mecanisme de vigilància de la fase S, SQ/TQ. El residu on s'ha descrit la fosforilació de la ciclina E1 per part del *checkpoint* es troba en la regió amino-terminal de la proteïna fora de la regió d'homologia amb la ciclina E2. Curiosament, la ciclina E2 presenta dos dominis que podrien ser fosforilables per les quinases transductores centrals del *checkpoint* ATM/ATR en la regió amino-terminal (figura 68).

En *S. cerevisiae* Clb6p, ortòleg de la ciclina E, s'ha observat que es fosforila per la quinasa efectora del *checkpoint* de fase S Rad53p *in vitro*, tot i que, igual que en humans, no s'ha aconseguit assignar la funció (Palou et al., 2010).

```

CCNE1:
MPRERRERDAKERDRTMKEDGGAEFARSRSRKRKANVTVFLQDPDEEMAKIDRTARDQCGSQPWDNNAVCAD
PCSLIPTPKEDDDRVYPNSTCKPRIIAPSRGSPPLVLSWANREEVVKIMLNKEKTYLRDQHFLQHPPLL
QPKMRAILLDWLMEVCEVYKLRHRETFYLAQDFFDRYMATQENVVKTLQLIGISSLFI AAKLEEIYPPKL
HQFAYVTDGACSGDEILTMELMIMKALKWRLSPLTIVSWLNVYMQVAYLNDLHEVLLPQYPQQIFIQIAE
LLDLCVLDVDCLEFPYGI LAASALYHFSSSELMQKVSQYQWCDIENCVKWMPVFAMVIRETGSSKCLKHFR
GVADEDAHNIQTHRDSL DLDLKDARAKKAMLSEQNRASPLPSGLLTPPQSGKKQSSGPEMA

CCNE2:
MSRRSSRLQAKQQPQPSQTESPQEAQIIQAKKRKTQDVKKRREEVTKKHQYEIRNCWPPVLSGGISPCI
IIETPHKEIGTSDFSRFTNYRFKNLFINPSPLPDLSWGCSKEVWLNMLKKESTRYVHDKHFEVLHSDLEPQ
MRSILLDWLLEVEVYTLHRETFYLAQDFDFRMLTQKDINKNMLQLIGITSLFIASKLEEIYAPKLQEF
AYVTDGACSEEDILRMELIILKALKWELCPVTIISWLNLFQVDALKDAPKVLPPQYSQETFIIQIAQLLD
LCILAIIDSLEFYRILTAALCHFTSIEVVKKASGLEWDSISECVDWMVPFVNVVKSTSPVKLKTFFKIP
MEDRHNIQTHNTYLAMLEEVNYINTFRKGGQLSPVCNGGIMTPPKSTKPPGKH
    
```

Figura 68. Seqüències aminoacídiques de la ciclina E1 i E2. En vermell es marca la regió homòloga entre les dues proteïnes. El domini SQ fosforilat de la ciclina E1 es marca en verd i està fora de la regió homòloga. La ciclina E2 presenta quatre dominis putativament fosforilables per les quinases transductores ATM/ATR, marcats en blau, dos dels quals estan en la regió N-terminal, fora de la regió d'homologia.

Per altra banda, també s'ha demostrat que proteïnes implicades en la degradació de la ciclina E2 són fosforilades de forma directa per ATM/ATR en resposta a dany (Matsuoka et al., 2007). Per un costat la proteïna adaptadora CDC4 que interacciona amb la ciclina permetent que sigui ubiquitinada pel complex ubiquitina ligasa E3 SCF. Per l'altre, la peptidil propil cis/trans isomerasa PIN1, que la seva depleció provoca una desregulació de la ciclina E, conduint a la seva acumulació (Yeh et al., 2006). De totes maneres no han estat estudiades les funcions d'aquestes fosforilacions.

2.3 Paper de Ciclina E2 en resposta a estrès replicatiu

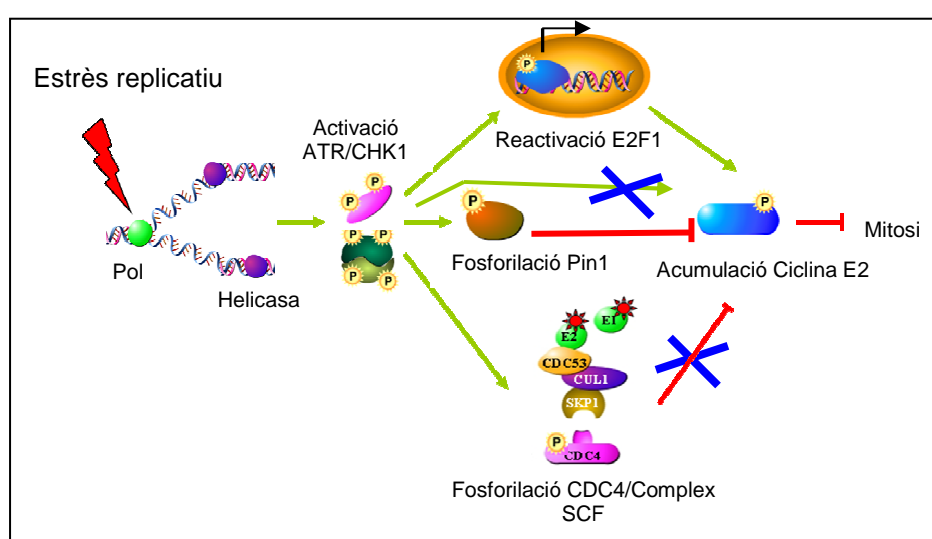
Per mimetitzar l'efecte d'acumulació de la ciclina E2 en la resposta del *checkpoint* de fase S a estrès replicatiu, la proteïna es va sobreexpressar ectòpicament de forma transitòria. Els resultats mostren un augment progressiu de cèl·lules en fase S (figura 64). Aquest fet ens va fer hipotetitzar que la sobreexpressió de la ciclina E2 podria estar implicada directament en l'aturada del cicle cel·lular que es produeix com a resposta de l'activació del *checkpoint*.

En diferents contextos s'ha observat que la sobreexpressió de la ciclina E1 produeix una inhibició de la progressió al llarg de la fase S (Spruck et al., 1999). L'explicació proposada fa referència a què elevats nivells de la ciclina E1 interfereixen amb el reclutament del complex MCM als orígens de replicació primerencs durant el principi de la fase G1 (Ekholm-Reed et al., 2004). Aquesta explicació no és vàlida en el model d'activació del *checkpoint*, ja que els nostres cultius cel·lulars foren sincronitzats en la transició G1/S, moment en el qual el complex MCM ja ha estat reclutat als orígens de replicació, i no és fins que les cèl·lules entren en fase S que el *checkpoint* s'activa i indueix l'acumulació de la ciclina E2.

Recentment, ha estat publicat un treball que mostren una acumulació de la ciclina E1 en resposta a dany al DNA generat per mitomicina C. Aquesta molècula provoca entrecreuaments en les cadenes del DNA. En el model observen que els elevats nivells de ciclina E1 competeixen amb la ciclina A per la unió a CDK2 (Lu et al., 2009). Aquest desplaçament estequiomètric provoca que el complex ciclina A-CDK2 no es formi i els orígens de replicació tardans no puguin ser activats (Coverley et al., 2002). Per tant, la ciclina E2 podria estar implicada en el bloqueig de la progressió al llarg del cicle cel·lular, a través d'aquesta hipòtesi.

2.4 Model proposat de la regulació de la ciclina E2 a través del *checkpoint* de fase S

Els resultats obtinguts en aquest estudi i d'altres dades publicades suggereixen un model de regulació de la ciclina E2 per part del mecanisme de vigilància de fase S basat en l'estabilització de la ciclina E2 a partir de tres efectes independents regulats pel *checkpoint*: i) Reactivació del factor de transcripció E2F1, ii) Fosforilació directa sobre la ciclina E2 i iii) Inhibició del complex ubiquitina ligasa SCF per fosforilació de la seva proteïna adaptadora CDC4 i per la proteïna PIN1 implicada en la degradació de la ciclina. Tot i això els dos últims punts hauran de ser demostrats experimentalment.



3. Ciclina E2 en la resposta a CPT

La ciclina E2 està sobreexpressada en un elevat nombre de tumors primaris (Fukuse et al., 2000; Iida et al., 1997; Payton et al., 2002; Wolowiec et al., 1995). Paral·lelament, els resultats d'aquesta tesi suggereixen que és una diana transcripcional en la resposta del *checkpoint* de fase S. Un cop s'activa el mecanisme de vigilància fa que els seus nivells augmentin i s'estabilitzin. Degut aquestes dues raons, la ciclina E2 podria estar jugant un paper important en la resposta a quimioteràpics que tinguin accions directes sobre el DNA o sobre el procés de replicació. Si això es confirmés podria ser utilitzada com a marcador predictiu de resposta tumoral al tractament. És conegut que cèl·lules tumorals que presenten el mecanisme de supervivència intacte són més resistents a aquest tipus de quimioteràpics (Dai and Grant, 2010). En aquest cas concret, com la ciclina E2 està sobreexpressada, podria produir-se un potenciament de la resposta, ja que les cèl·lules al

progressar més lentament al llarg de la fase S podrien reparar millor les lesions induïdes en el DNA per aquests tractaments.

Com el interès del nostre laboratori es centra en l'estudi del càncer colorrectal, es va decidir estudiar l'efecte de la sobreexpressió de la ciclina en la resposta a inhibidors de topoisomerasa I, utilitzats habitualment en la teràpia de la malaltia, concretament s'utilitzà per l'estudi la camptotecina (CPT).

Actualment, el càncer colorrectal és el segon que presenta més incidència en el món occidental, essent només superat pel de pulmó en homes i el de mama en dones.

Tot i això, la previsió de la *Sociedad Española de Oncología Médica* per l'any 2010 indica que passarà a ser el càncer amb més nous casos diagnosticats en Espanya.

En tot el món es diagnostiquen al voltant de 1.000.000 de nous casos anuals, dels quals només un 50% presenten un pronòstic favorable durant els 5 primers anys (Berrino et al., 2007; Gatta et al., 2009; Sant et al., 2003).

La falta de resposta al tractament d'aproximadament el 50% dels pacients evidencia la necessitat d'obtenir noves molècules quimioterapèutiques més eficaces. Sumat a què els tractaments actuals només són efectius en determinats grups de pacients fa necessària l'obtenció de marcadors predictius de resposta, per poder seleccionar els pacients on seran efectius i utilitzar una teràpia més personalitzada.

En la teràpia del càncer colorrectal avançat s'utilitza el irinotecan (CPT11) que és una molècula derivada CPT i que presenta el mateix mecanisme d'acció. Aquesta molècula genera unions estables entre el DNA i la topoisomerasa I, inhibint la funció de l'enzim i evitant que les cadenes de DNA es puguin relaxar del seu alt grau d'enrotllament (Hsiang et al., 1985; Huang et al., 2010). D'aquesta manera queden compromesos els processos de replicació i transcripció, ja que les respectives maquinàries no poden interaccionar correctament amb la cromatina. Els inhibidors de topoisomerasa I també indueix trencaments de cadena doble del DNA, pel xoc de la maquinària replicativa o transcripcional amb els complexos covalents DNA-topoisomerasa I (Hsiang et al., 1989; Ryan et al., 1991). Aquestes lesions són capaces d'activar el *checkpoint* de fase S tant la via d'ATR (Cliby et al., 2002) com la d'ATM (Pommier et al., 2006b).

La taxa de resposta al CPT11 en el tractament dels tumors colorrectals avançats, varia d'un 10% quan es subministra com teràpia única, fins un 50% quan es dóna en combinació amb 5-fluorouracil (anàleg de pirimidina que bloqueja la replicació) i leucovin (derivat de la vitamina B que modula l'acció del 5-fluorouracil).

Per estudiar si la ciclina E2 pot modular la sensibilitat de cèl·lules tumorals amb inhibidors de topoisomerasa I, es va mimetitzar l'augment dels nivells de la proteïna observats en tumors, per realitzar-ho es van generar clons individuals de cèl·lules HeLa que sobreexpressen la ciclina E2. Un cop confirmats per WB, es seleccionaren dos clon amb alts nivells de la proteïna i s'efectuaren assaigs de viabilitat cel·lular en resposta a CPT, realitzant l'assaig en tres experiments independents. Com es pot observar a la figura 67A s'aprecia que els clons de cèl·lules HeLa amb elevats nivells de ciclina E2 presenten una major viabilitat que les cèl·lules control. A partir de les corbes de viabilitat, es calculà el IC50 per cada clon. Aquest paràmetre indica la concentració necessària de CPT per obtenir una viabilitat del 50%, paràmetre que indica de sensibilitat cel·lular a un tractament. Com es mostra a la figura 67B, els clons amb alts nivells de ciclina E2 presenten un IC50 entorn als 0,2 μ M de CPT, mentre que els controls no arriben a 0,1 μ M de CPT, aquestes diferències són estadísticament significatives. Això indica que *in vitro* la sobreexpressió de ciclina E2 confereix a les cèl·lules HeLa una major resistència al inhibidor de topoisomerasa I. Per tant, aquests resultats indiquen que la ciclina E2 podria ser un marcador de predicció al tractament tumoral amb aquest tipus de quimioteràpic, per aquest motiu, ja s'està relacionant la sobreexpressió de la ciclina E2 *in situ*, en teixit tumoral, a la resposta al fàrmac.

Si és confirmés la ciclina E2 com un marcador de resposta, podria ser utilitzat com a marcador únic o combinat amb altres ja descrits per elucidar els subgrups de pacients que respondran millor a la teràpia basada en inhibidors de topoisomerasa I. El marcador per excel·lència, és la pròpia diana de CPT i CPT11, la topoisomerasa I, que s'ha demostrat que pacients amb alts nivells responen millor (Braun et al., 2008). Un altra marcador descrit recentment és l'aprtaxina (APTX), aquesta proteïna és un factor de reparació implicat en la resolució de trencaments tant de cadena senzilla com doble del DNA (Mosesso et al., 2005), de manera que si el tumor colorrectal presenta alts nivells presenta una major resistència (Doposo et al., 2010).

La combinació de marcadors de resposta ajudaran l'oncòleg a establir una teràpia individualitzada i més efectiva per cada pacient.

Conclusions

*“Si la teva intenció es descriure la veritat, fes-ho amb senzillesa i
l'elegància deixa-la al sastre”*

Albert Einstein (Físic)

1. Comparant els proteomes d'una soca salvatge i una defectiva pel *checkpoint* de fase S de *S. cerevisiae* en condicions d'estrès replicatiu a partir d'un anàlisi 2D-DIGE hem trobat 19 punts diferencials, dels quals hem identificat 13 proteïnes per espectrometria de masses.

2. No s'han identificat proteïnes prèviament relacionades amb la resposta del *checkpoint* de fase S.

3. S'han identificat dos proteïnes implicades en el cicle cel·lular que van ser estudiades de forma individual: Smc2p (nucli del complex condensina) i Scp160p (implicada en el manteniment d'euploïdia).

- No s'ha pogut confirmar Smc2p com a diana del *checkpoint* de fase S, ja que no s'observen canvis en la seva quantitat ni en la mobilitat electroforètica dependents de l'activació de la ruta. Tot i això seria convenient realitzar experiments enfocats a estudiar específicament modificacions post-traduccionals.
- Scp160p tampoc s'ha confirmat com a diana del mecanisme de vigilància de fase S, ja que no s'observaren diferències ni en quantitat ni en la mobilitat electroforètica de la proteïna dependents de l'activació del *checkpoint*.

4. Comparant el transcriptoma de cèl·lules HeLa en condicions activadores i inhibidores del *checkpoint* de fase S a través de microxips d'expressió, s'han obtingut 137 seqüències que varien la seva expressió de forma significativa i que segueixen el patró específic d'activació del sistema de vigilància.

5. L'anàlisi a partir del IPA dels candidats obtinguts ha demostrat un enriquiment en funcions cel·lulars i processos moleculars relacionats amb el *checkpoint*. Per altra banda, es relacionaren els gens candidats amb malalties humanes destacant les implicacions en càncer.

6. Dins dels 137 candidats hi ha 15 gens que ja havien estat implicats prèviament en la resposta del *checkpoint* de fase S.

7. 14 dels gens candidats han estat validats per PCR a temps real, confirmant-se 11 d'ells. Aquest fet mostra que els resultats dels microxips tenen una especificitat del 78,5%.

8. Els nivells de ciclina E2 són estabilitzats *in vivo* en resposta a estrès replicatiu de forma dependent de l'activació del *checkpoint* de fase S. Confirmant-se així com a nova diana.

9. La traducció dels elevats nivells de RNA missatgers és necessària per estabilitzar la ciclina E2, tot i que no és suficient. El *checkpoint* intervé en algun altre nivell per estabilitzar la proteïna.

10. La sobreexpressió de la ciclina E2 en cultius cel·lulars no pertorbats produeix una acumulació de cèl·lules en fase S.

11. La sobreexpressió de ciclina E2 *in vitro* modula la resposta a inhibidors de topoisomerasa I en cultius de cèl·lules HeLa, produint una major resistència al fàrmac.

Bibliografia

- Abraham, R.T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* 15, 2177-2196.
- Abraham, R.T. (2004). PI 3-kinase related kinases: 'big' players in stress-induced signaling pathways. *DNA Repair (Amst)* 3, 883-887.
- Agarwal, R., Tang, Z., Yu, H., and Cohen-Fix, O. (2003). Two distinct pathways for inhibiting pds1 ubiquitination in response to DNA damage. *J Biol Chem* 278, 45027-45033.
- Akama, Y., Yasui, W., Yokozaki, H., Kuniyasu, H., Kitahara, K., Ishikawa, T., and Tahara, E. (1995). Frequent amplification of the cyclin E gene in human gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 86, 617-621.
- Akli, S., Zheng, P.J., Multani, A.S., Wingate, H.F., Pathak, S., Zhang, N., Tucker, S.L., Chang, S., and Keyomarsi, K. (2004). Tumor-specific low molecular weight forms of cyclin E induce genomic instability and resistance to p21, p27, and antiestrogens in breast cancer. *Cancer Res* 64, 3198-3208.
- Aktas, D., Arno, M.J., Rassool, F., and Mufti, G.J. (2002). Analysis of CHK2 in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 26, 985-987.
- Alani, E., Thresher, R., Griffith, J.D., and Kolodner, R.D. (1992). Characterization of DNA-binding and strand-exchange stimulation properties of γ -RPA, a yeast single-strand-DNA-binding protein. *J Mol Biol* 227, 54-71.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D. (1996). *Biología Molecular de la Célula*.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Biología Molecular de la Célula*.
- Anderson, C.W., and Lees-Miller, S.P. (1992). The nuclear serine/threonine protein kinase DNA-PK. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2, 283-314.
- Aono, N., Sutani, T., Tomonaga, T., Mochida, S., and Yanagida, M. (2002). Cnd2 has dual roles in mitotic condensation and interphase. *Nature* 417, 197-202.
- Aparicio, J.G., Viggiani, C.J., Gibson, D.G., and Aparicio, O.M. (2004). The Rpd3-Sin3 histone deacetylase regulates replication timing and enables intra-S origin control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 24, 4769-4780.
- Aparicio, O.M., Stout, A.M., and Bell, S.P. (1999). Differential assembly of Cdc45p and DNA polymerases at early and late origins of DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9130-9135.
- Aristizabal-Corrales, D. (2009). Identificación de nuevos genes involucrados en el checkpoint de fase S del ciclo celular. Informe Tesina Màster en Biologia del Desenvolupament i Genètica (UB).
- Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499-506.

Bales, E.S., Dietrich, C., Bandyopadhyay, D., Schwahn, D.J., Xu, W., Didenko, V., Leiss, P., Conrad, N., Pereira-Smith, O., Orenco, I., *et al.* (1999). High levels of expression of p27KIP1 and cyclin E in invasive primary malignant melanomas. *J Invest Dermatol* 113, 1039-1046.

Bao, S., Lu, T., Wang, X., Zheng, H., Wang, L.E., Wei, Q., Hittelman, W.N., and Li, L. (2004). Disruption of the Rad9/Rad1/Hus1 (9-1-1) complex leads to checkpoint signaling and replication defects. *Oncogene* 23, 5586-5593.

Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* 3, 421-429.

Bashkirov, V.I., Bashkirova, E.V., Haghazari, E., and Heyer, W.D. (2003). Direct kinase-to-kinase signaling mediated by the FHA phosphoprotein recognition domain of the Dun1 DNA damage checkpoint kinase. *Mol Cell Biol* 23, 1441-1452.

Beckerman, R., Donner, A.J., Mattia, M., Peart, M.J., Manley, J.L., Espinosa, J.M., and Prives, C. (2009). A role for Chk1 in blocking transcriptional elongation of p21 RNA during the S-phase checkpoint. *Genes Dev* 23, 1364-1377.

Bedrosian, I., Lee, C., Tucker, S.L., Palla, S.L., Lu, K., and Keyomarsi, K. (2007). Cyclin E-associated kinase activity predicts response to platinum-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 13, 4800-4806.

Bedrosian, I., Lu, K.H., Verschraegen, C., and Keyomarsi, K. (2004). Cyclin E deregulation alters the biologic properties of ovarian cancer cells. *Oncogene* 23, 2648-2657.

Berrino, F., De Angelis, R., Sant, M., Rosso, S., Bielska-Lasota, M., Coebergh, J.W., and Santaquilani, M. (2007). Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995-99: results of the EURO CARE-4 study. *Lancet Oncol* 8, 773-783.

Bjursell, G., and Reichard, P. (1973). Effects of thymidine on deoxyribonucleoside triphosphate pools and deoxyribonucleic acid synthesis in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 248, 3904-3909.

Braun, M.S., Richman, S.D., Quirke, P., Daly, C., Adlard, J.W., Elliott, F., Barrett, J.H., Selby, P., Meade, A.M., Stephens, R.J., *et al.* (2008). Predictive biomarkers of chemotherapy efficacy in colorectal cancer: results from the UK MRC FOCUS trial. *J Clin Oncol* 26, 2690-2698.

Brondello, J.M., Ducommun, B., Fernandez, A., and Lamb, N.J. (2007). Linking PCNA-dependent replication and ATR by human Claspin. *Biochem Biophys Res Commun* 354, 1028-1033.

Busino, L., Donzelli, M., Chiesa, M., Guardavaccaro, D., Ganoth, D., Dorrello, N.V., Hershko, A., Pagano, M., and Draetta, G.F. (2003). Degradation of Cdc25A by beta-TrCP during S phase and in response to DNA damage. *Nature* 426, 87-91.

Byun, T.S., Pacek, M., Yee, M.C., Walter, J.C., and Cimprich, K.A. (2005). Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes Dev* 19, 1040-1052.

Cao, G., Liu, L.M., and Cleary, S.F. (1991). Modified method of mammalian cell synchronization improves yield and degree of synchronization. *Exp Cell Res* 193, 405-410.

- Carcagno, A.L., Ogara, M.F., Sonzogni, S.V., Marazita, M.C., Sirkin, P.F., Ceruti, J.M., and Canepa, E.T. (2009). E2F1 transcription is induced by genotoxic stress through ATM/ATR activation. *IUBMB Life* *61*, 537-543.
- Carr, A.M. (2003). Molecular biology. Beginning at the end. *Science* *300*, 1512-1513.
- Castro, A., Bernis, C., Vigneron, S., Labbe, J.C., and Lorca, T. (2005). The anaphase-promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle. *Oncogene* *24*, 314-325.
- Clarke, D.J., Segal, M., Jensen, S., and Reed, S.I. (2001). Mec1p regulates Pds1p levels in S phase: complex coordination of DNA replication and mitosis. *Nat Cell Biol* *3*, 619-627.
- Clerici, M., Baldo, V., Mantiero, D., Lotterberger, F., Lucchini, G., and Longhese, M.P. (2004). A Tel1/MRX-dependent checkpoint inhibits the metaphase-to-anaphase transition after UV irradiation in the absence of Mec1. *Mol Cell Biol* *24*, 10126-10144.
- Cliby, W.A., Lewis, K.A., Lilly, K.K., and Kaufmann, S.H. (2002). S phase and G2 arrests induced by topoisomerase I poisons are dependent on ATR kinase function. *J Biol Chem* *277*, 1599-1606.
- Clurman, B.E., and Roberts, J.M. (1995). Cell cycle and cancer. *J Natl Cancer Inst* *87*, 1499-1501.
- Clurman, B.E., Sheaff, R.J., Thress, K., Groudine, M., and Roberts, J.M. (1996). Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation. *Genes Dev* *10*, 1979-1990.
- Cobb, J.A., Bjergbaek, L., Shimada, K., Frei, C., and Gasser, S.M. (2003). DNA polymerase stabilization at stalled replication forks requires Mec1 and the RecQ helicase Sgs1. *EMBO J* *22*, 4325-4336.
- Cobb, J.A., Schleker, T., Rojas, V., Bjergbaek, L., Tercero, J.A., and Gasser, S.M. (2005). Replisome instability, fork collapse, and gross chromosomal rearrangements arise synergistically from Mec1 kinase and RecQ helicase mutations. *Genes Dev* *19*, 3055-3069.
- Cobrinik, D. (2005). Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* *24*, 2796-2809.
- Cortes, A., Huertas, D., Fanti, L., Pimpinelli, S., Marsellach, F.X., Pina, B., and Azorin, F. (1999). DDP1, a single-stranded nucleic acid-binding protein of *Drosophila*, associates with pericentric heterochromatin and is functionally homologous to the yeast Scp160p, which is involved in the control of cell ploidy. *EMBO J* *18*, 3820-3833.
- Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J., and Elledge, S.J. (2001). ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science* *294*, 1713-1716.
- Coverley, D., Laman, H., and Laskey, R.A. (2002). Distinct roles for cyclins E and A during DNA replication complex assembly and activation. *Nat Cell Biol* *4*, 523-528.
- Cross, F.R. (1995). Starting the cell cycle: what's the point? *Curr Opin Cell Biol* *7*, 790-797.
- Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., Verslype, C., *et al.* (2004). Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* *351*, 337-345.

Chan, F.K., Zhang, J., Cheng, L., Shapiro, D.N., and Winoto, A. (1995). Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4. *Mol Cell Biol* 15, 2682-2688.

Chen, H.H., Wang, Y.C., and Fann, M.J. (2006). Identification and characterization of the CDK12/cyclin L1 complex involved in alternative splicing regulation. *Mol Cell Biol* 26, 2736-2745.

Chen, J., Jackson, P.K., Kirschner, M.W., and Dutta, A. (1995). Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature* 374, 386-388.

Chen, J., Larochelle, S., Li, X., and Suter, B. (2003). Xpd/Ercc2 regulates CAK activity and mitotic progression. *Nature* 424, 228-232.

Chen, S.H., Smolka, M.B., and Zhou, H. (2007). Mechanism of Dun1 activation by Rad53 phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 282, 986-995.

Cheng, L., Hunke, L., and Hardy, C.F. (1998). Cell cycle regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* polo-like kinase cdc5p. *Mol Cell Biol* 18, 7360-7370.

D'Amours, D., and Jackson, S.P. (2002). The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 317-327.

Dai, Y., and Grant, S. (2010). New insights into checkpoint kinase 1 in the DNA damage response signaling network. *Clin Cancer Res* 16, 376-383.

Davis, H.E., Rosinski, M., Morgan, J.R., and Yarmush, M.L. (2004). Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. *Biophys J* 86, 1234-1242.

De Bondt, H.L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H.D., Morgan, D.O., and Kim, S.H. (1993). Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature* 363, 595-602.

De Bont, R., and van Larebeke, N. (2004). Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* 19, 169-185.

DeGregori, J., Kowalik, T., and Nevins, J.R. (1995). Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Mol Cell Biol* 15, 4215-4224.

Demetrick, D.J., Matsumoto, S., Hannon, G.J., Okamoto, K., Xiong, Y., Zhang, H., and Beach, D.H. (1995). Chromosomal mapping of the genes for the human cell cycle proteins cyclin C (CCNC), cyclin E (CCNE), p21 (CDKN1) and KAP (CDKN3). *Cytogenet Cell Genet* 69, 190-192.

Desai, D., Wessling, H.C., Fisher, R.P., and Morgan, D.O. (1995). Effects of phosphorylation by CAK on cyclin binding by CDC2 and CDK2. *Mol Cell Biol* 15, 345-350.

Desany, B.A., Alcasabas, A.A., Bachant, J.B., and Elledge, S.J. (1998). Recovery from DNA replicational stress is the essential function of the S-phase checkpoint pathway. *Genes Dev* 12, 2956-2970.

Dhillon, N.K., and Mudryj, M. (2002). Ectopic expression of cyclin E in estrogen responsive cells abrogates antiestrogen mediated growth arrest. *Oncogene* 21, 4626-4634.

- Dodson, R.E., and Shapiro, D.J. (1997). Vigilin, a ubiquitous protein with 14 K homology domains, is the estrogen-inducible vitellogenin mRNA 3'-untranslated region-binding protein. *J Biol Chem* 272, 12249-12252.
- Dong, X., Wang, L., Taniguchi, K., Wang, X., Cunningham, J.M., McDonnell, S.K., Qian, C., Marks, A.F., Slager, S.L., Peterson, B.J., *et al.* (2003). Mutations in CHEK2 associated with prostate cancer risk. *Am J Hum Genet* 72, 270-280.
- Doposo, H., Mateo-Lozano, S., Elez, E., Landolfi, S., Ramos Pascual, F.J., Hernandez-Losa, J., Mazzolini, R., Rodrigues, P., Bazzocco, S., Carreras, M.J., *et al.* (2010). Aprataxin tumor levels predict response of colorectal cancer patients to irinotecan-based treatment. *Clin Cancer Res* 16, 2375-2382.
- Dosaka-Akita, H., Hommura, F., Mishina, T., Ogura, S., Shimizu, M., Katoh, H., and Kawakami, Y. (2001). A risk-stratification model of non-small cell lung cancers using cyclin E, Ki-67, and ras p21: different roles of G1 cyclins in cell proliferation and prognosis. *Cancer Res* 61, 2500-2504.
- Douillard, J.Y., Cunningham, D., Roth, A.D., Navarro, M., James, R.D., Karasek, P., Jandik, P., Iveson, T., Carmichael, J., Alakl, M., *et al.* (2000). Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* 355, 1041-1047.
- Dulic, V., Lees, E., and Reed, S.I. (1992). Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science* 257, 1958-1961.
- Duronio, R.J., and O'Farrell, P.H. (1995). Developmental control of the G1 to S transition in *Drosophila*: cyclin E is a limiting downstream target of E2F. *Genes Dev* 9, 1456-1468.
- Ehrenhofer-Murray, A.E. (2004). Chromatin dynamics at DNA replication, transcription and repair. *Eur J Biochem* 271, 2335-2349.
- Ekholm-Reed, S., Mendez, J., Tedesco, D., Zetterberg, A., Stillman, B., and Reed, S.I. (2004). Deregulation of cyclin E in human cells interferes with prereplication complex assembly. *J Cell Biol* 165, 789-800.
- Elledge, S.J. (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274, 1664-1672.
- Enoch, T., Carr, A.M., and Nurse, P. (1992). Fission yeast genes involved in coupling mitosis to completion of DNA replication. *Genes Dev* 6, 2035-2046.
- Erlanson, M., Portin, C., Linderholm, B., Lindh, J., Roos, G., and Landberg, G. (1998). Expression of cyclin E and the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in malignant lymphomas-prognostic implications. *Blood* 92, 770-777.
- Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D., and Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33, 389-396.
- Falck, J., Mailand, N., Syljuasen, R.G., Bartek, J., and Lukas, J. (2001). The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* 410, 842-847.
- Falck, J., Petrini, J.H., Williams, B.R., Lukas, J., and Bartek, J. (2002). The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nat Genet* 30, 290-294.

Fay, D.S., and Han, M. (2000). Mutations in *cye-1*, a *Caenorhabditis elegans* cyclin E homolog, reveal coordination between cell-cycle control and vulval development. *Development* 127, 4049-4060.

Fedier, A., Steiner, R.A., Schwarz, V.A., Lenherr, L., Haller, U., and Fink, D. (2003). The effect of loss of *Brc1* on the sensitivity to anticancer agents in p53-deficient cells. *Int J Oncol* 22, 1169-1173.

Filatov, D., Bjorklund, S., Johansson, E., and Thelander, L. (1996). Induction of the mouse ribonucleotide reductase R1 and R2 genes in response to DNA damage by UV light. *J Biol Chem* 271, 23698-23704.

Fisher, R.P., and Morgan, D.O. (1994). A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* 78, 713-724.

Fisk, H.A., and Winey, M. (2001). The mouse *Mps1p*-like kinase regulates centrosome duplication. *Cell* 106, 95-104.

Foray, N., Marot, D., Gabriel, A., Randrianarison, V., Carr, A.M., Perricaudet, M., Ashworth, A., and Jeggo, P. (2003). A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *EMBO J* 22, 2860-2871.

Freeman, L., Aragon-Alcaide, L., and Strunnikov, A. (2000). The condensin complex governs chromosome condensation and mitotic transmission of rDNA. *J Cell Biol* 149, 811-824.

Frey, S., Pool, M., and Seedorf, M. (2001). *Scp160p*, an RNA-binding, polysome-associated protein, localizes to the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae* in a microtubule-dependent manner. *J Biol Chem* 276, 15905-15912.

Fujimoto, H., Onishi, N., Kato, N., Takekawa, M., Xu, X.Z., Kosugi, A., Kondo, T., Imamura, M., Oishi, I., Yoda, A., *et al.* (2006). Regulation of the antioncogenic *Chk2* kinase by the oncogenic *Wip1* phosphatase. *Cell Death Differ* 13, 1170-1180.

Fukuse, T., Hirata, T., Naiki, H., Hitomi, S., and Wada, H. (2000). Prognostic significance of cyclin E overexpression in resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 60, 242-244.

Gabai, V.L., O'Callaghan-Sunol, C., Meng, L., Sherman, M.Y., and Yaglom, J. (2008). Triggering senescence programs suppresses *Chk1* kinase and sensitizes cells to genotoxic stresses. *Cancer Res* 68, 1834-1842.

Gale, J.M., Nissen, K.A., and Smerdon, M.J. (1987). UV-induced formation of pyrimidine dimers in nucleosome core DNA is strongly modulated with a period of 10.3 bases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 6644-6648.

Gardner, R., Putnam, C.W., and Weinert, T. (1999). *RAD53*, *DUN1* and *PDS1* define two parallel G2/M checkpoint pathways in budding yeast. *EMBO J* 18, 3173-3185.

Gasch, A.P., Huang, M., Metzner, S., Botstein, D., Elledge, S.J., and Brown, P.O. (2001). Genomic expression responses to DNA-damaging agents and the regulatory role of the yeast ATR homolog *Mec1p*. *Mol Biol Cell* 12, 2987-3003.

Gatta, G., Zigon, G., Capocaccia, R., Coebergh, J.W., Desandes, E., Kaatsch, P., Pastore, G., Peris-Bonet, R., and Stiller, C.A. (2009). Survival of European children and young adults with cancer diagnosed 1995-2002. *Eur J Cancer* 45, 992-1005.

Geley, S., Kramer, E., Gieffers, C., Gannon, J., Peters, J.M., and Hunt, T. (2001). Anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis of human cyclin A starts at the beginning of mitosis and is not subject to the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol* 153, 137-148.

Geng, Y., Eaton, E.N., Picon, M., Roberts, J.M., Lundberg, A.S., Gifford, A., Sardet, C., and Weinberg, R.A. (1996). Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene* 12, 1173-1180.

Geng, Y., Yu, Q., Sicinska, E., Das, M., Schneider, J.E., Bhattacharya, S., Rideout, W.M., Bronson, R.T., Gardner, H., and Sicinski, P. (2003). Cyclin E ablation in the mouse. *Cell* 114, 431-443.

Gilbert, C.S., Green, C.M., and Lowndes, N.F. (2001). Budding yeast Rad9 is an ATP-dependent Rad53 activating machine. *Mol Cell* 8, 129-136.

Gottifredi, V., and Prives, C. (2005). The S phase checkpoint: when the crowd meets at the fork. *Semin Cell Dev Biol* 16, 355-368.

Green, C.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Lowndes, N.F. (2000). A novel Rad24 checkpoint protein complex closely related to replication factor C. *Curr Biol* 10, 39-42.

Griffith, J.D., Lindsey-Boltz, L.A., and Sancar, A. (2002). Structures of the human Rad17-replication factor C and checkpoint Rad 9-1-1 complexes visualized by glycerol spray/low voltage microscopy. *J Biol Chem* 277, 15233-15236.

Gu, Y., Rosenblatt, J., and Morgan, D.O. (1992). Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15. *EMBO J* 11, 3995-4005.

Guan, K.L., Jenkins, C.W., Li, Y., Nichols, M.A., Wu, X., O'Keefe, C.L., Matera, A.G., and Xiong, Y. (1994). Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev* 8, 2939-2952.

Gudas, J.M., Payton, M., Thukral, S., Chen, E., Bass, M., Robinson, M.O., and Coats, S. (1999). Cyclin E2, a novel G1 cyclin that binds Cdk2 and is aberrantly expressed in human cancers. *Mol Cell Biol* 19, 612-622.

Guillemain, G., Ma, E., Mauger, S., Miron, S., Thai, R., Guerois, R., Ochsenbein, F., and Marsolier-Kergoat, M.C. (2007). Mechanisms of checkpoint kinase Rad53 inactivation after a double-strand break in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 27, 3378-3389.

Gupta, M., Fan, S., Zhan, Q., Kohn, K.W., O'Connor, P.M., and Pommier, Y. (1997). Inactivation of p53 increases the cytotoxicity of camptothecin in human colon HCT116 and breast MCF-7 cancer cells. *Clin Cancer Res* 3, 1653-1660.

Hannon, G.J., and Beach, D. (1994). p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 371, 257-261.

Hannon, G.J., Casso, D., and Beach, D. (1994). KAP: a dual specificity phosphatase that interacts with cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1731-1735.

Hardesty, B., Obrig, T., Irvin, J., and Culp, W. (1973). The effect of sodium fluoride, edeine, and cycloheximide on peptide synthesis with reticulocyte ribosomes. *Basic Life Sci* 1, 377-392.

Hartwell, L. (1992). Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell* 71, 543-546.

Hartwell, L.H., and Kastan, M.B. (1994). Cell cycle control and cancer. *Science* 266, 1821-1828.

Hartwell, L.H., and Weinert, T.A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246, 629-634.

Heffernan, T.P., Simpson, D.A., Frank, A.R., Heinloth, A.N., Paules, R.S., Cordeiro-Stone, M., and Kaufmann, W.K. (2002). An ATR- and Chk1-dependent S checkpoint inhibits replicon initiation following UVC-induced DNA damage. *Mol Cell Biol* 22, 8552-8561.

Hinchcliffe, E.H., Li, C., Thompson, E.A., Maller, J.L., and Sluder, G. (1999). Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* egg extracts. *Science* 283, 851-854.

Hirano, T., Kobayashi, R., and Hirano, M. (1997). Condensins, chromosome condensation protein complexes containing XCAP-C, XCAP-E and a *Xenopus* homolog of the *Drosophila* Barren protein. *Cell* 89, 511-521.

Hirano, T., and Mitchison, T.J. (1994). A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation in vitro. *Cell* 79, 449-458.

Hirao, A., Cheung, A., Duncan, G., Girard, P.M., Elia, A.J., Wakeham, A., Okada, H., Sarkissian, T., Wong, J.A., Sakai, T., *et al.* (2002). Chk2 is a tumor suppressor that regulates apoptosis in both an ataxia telangiectasia mutated (ATM)-dependent and an ATM-independent manner. *Mol Cell Biol* 22, 6521-6532.

Hirota, T., Gerlich, D., Koch, B., Ellenberg, J., and Peters, J.M. (2004). Distinct functions of condensin I and II in mitotic chromosome assembly. *J Cell Sci* 117, 6435-6445.

Hoffmann, I., Draetta, G., and Karsenti, E. (1994). Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition. *EMBO J* 13, 4302-4310.

Hsiang, Y.H., Hertzberg, R., Hecht, S., and Liu, L.F. (1985). Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem* 260, 14873-14878.

Hsiang, Y.H., Lihou, M.G., and Liu, L.F. (1989). Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Res* 49, 5077-5082.

Hu, F., Wang, Y., Liu, D., Li, Y., Qin, J., and Elledge, S.J. (2001). Regulation of the Bub2/Bfa1 GAP complex by Cdc5 and cell cycle checkpoints. *Cell* 107, 655-665.

Huang, M., Zhou, Z., and Elledge, S.J. (1998). The DNA replication and damage checkpoint pathways induce transcription by inhibition of the Crt1 repressor. *Cell* 94, 595-605.

Huang, T.H., Chen, H.C., Chou, S.M., Yang, Y.C., Fan, J.R., and Li, T.K. (2010). Cellular processing determinants for the activation of damage signals in response to topoisomerase I-linked DNA breakage. *Cell Res* 20, 1060-1075.

- Huertas, D., Cortes, A., Casanova, J., and Azorin, F. (2004). *Drosophila* DDP1, a multi-KH-domain protein, contributes to centromeric silencing and chromosome segregation. *Curr Biol* 14, 1611-1620.
- Iida, H., Towatari, M., Tanimoto, M., Morishita, Y., Kodera, Y., and Saito, H. (1997). Overexpression of cyclin E in acute myelogenous leukemia. *Blood* 90, 3707-3713.
- Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U., and Speed, T.P. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4, 249-264.
- Ishimi, Y., Komamura-Kohno, Y., Kwon, H.J., Yamada, K., and Nakanishi, M. (2003). Identification of MCM4 as a target of the DNA replication block checkpoint system. *J Biol Chem* 278, 24644-24650.
- Ivanov, I., Lo, K.C., Hawthorn, L., Cowell, J.K., and Ionov, Y. (2007). Identifying candidate colon cancer tumor suppressor genes using inhibition of nonsense-mediated mRNA decay in colon cancer cells. *Oncogene* 26, 2873-2884.
- Jackson, J.R., Gilmartin, A., Imburgia, C., Winkler, J.D., Marshall, L.A., and Roshak, A. (2000). An indolocarbazole inhibitor of human checkpoint kinase (Chk1) abrogates cell cycle arrest caused by DNA damage. *Cancer Res* 60, 566-572.
- Jeffrey, P.D., Russo, A.A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J., and Pavletich, N.P. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 376, 313-320.
- Jiang, K., Pereira, E., Maxfield, M., Russell, B., Godelock, D.M., and Sanchez, Y. (2003). Regulation of Chk1 includes chromatin association and 14-3-3 binding following phosphorylation on Ser-345. *J Biol Chem* 278, 25207-25217.
- Kai, M., Boddy, M.N., Russell, P., and Wang, T.S. (2005). Replication checkpoint kinase Cds1 regulates Mus81 to preserve genome integrity during replication stress. *Genes Dev* 19, 919-932.
- Kaldis, P. (1999). The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals. *Cell Mol Life Sci* 55, 284-296.
- Kato, J.Y., Matsuoka, M., Strom, D.K., and Sherr, C.J. (1994). Regulation of cyclin D-dependent kinase 4 (cdk4) by cdk4-activating kinase. *Mol Cell Biol* 14, 2713-2721.
- Kim, H.S., and Brill, S.J. (2003). MEC1-dependent phosphorylation of yeast RPA1 in vitro. *DNA Repair (Amst)* 2, 1321-1335.
- Klotz, K., Cepeda, D., Tan, Y., Sun, D., Sangfelt, O., and Spruck, C. (2008). SCF(Fbxw7/hCdc4) targets cyclin E2 for ubiquitin-dependent proteolysis. *Exp Cell Res*.
- Knoblich, J.A., Sauer, K., Jones, L., Richardson, H., Saint, R., and Lehner, C.F. (1994). Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. *Cell* 77, 107-120.
- Koepp, D.M., Schaefer, L.K., Ye, X., Keyomarsi, K., Chu, C., Harper, J.W., and Elledge, S.J. (2001). Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science* 294, 173-177.

Koff, A., Cross, F., Fisher, A., Schumacher, J., Leguellec, K., Philippe, M., and Roberts, J.M. (1991). Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. *Cell* 66, 1217-1228.

Kraakman-van der Zwet, M., Overkamp, W.J., Friedl, A.A., Klein, B., Verhaegh, G.W., Jaspers, N.G., Midro, A.T., Eckardt-Schupp, F., Lohman, P.H., and Zdzienicka, M.Z. (1999). Immortalization and characterization of Nijmegen Breakage syndrome fibroblasts. *Mutat Res* 434, 17-27.

Kraft, C., Vodermaier, H.C., Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, F., and Peters, J.M. (2005). The WD40 propeller domain of Cdh1 functions as a destruction box receptor for APC/C substrates. *Mol Cell* 18, 543-553.

Krishna, T.S., Kong, X.P., Gary, S., Burgers, P.M., and Kuriyan, J. (1994). Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell* 79, 1233-1243.

Krokan, H., Wist, E., and Krokan, R.H. (1981). Aphidicolin inhibits DNA synthesis by DNA polymerase alpha and isolated nuclei by a similar mechanism. *Nucleic Acids Res* 9, 4709-4719.

Kumagai, A., and Dunphy, W.G. (2000). Claspin, a novel protein required for the activation of Chk1 during a DNA replication checkpoint response in *Xenopus* egg extracts. *Mol Cell* 6, 839-849.

Kumagai, A., and Dunphy, W.G. (2003). Repeated phosphopeptide motifs in Claspin mediate the regulated binding of Chk1. *Nat Cell Biol* 5, 161-165.

Lam, E.W., and La Thangue, N.B. (1994). DP and E2F proteins: coordinating transcription with cell cycle progression. *Curr Opin Cell Biol* 6, 859-866.

Lang, B.D., Li, A., Black-Brewster, H.D., and Fridovich-Keil, J.L. (2001). The brefeldin A resistance protein Bfr1p is a component of polyribosome-associated mRNP complexes in yeast. *Nucleic Acids Res* 29, 2567-2574.

Lauper, N., Beck, A.R., Cariou, S., Richman, L., Hofmann, K., Reith, W., Slingerland, J.M., and Amati, B. (1998). Cyclin E2: a novel CDK2 partner in the late G1 and S phases of the mammalian cell cycle. *Oncogene* 17, 2637-2643.

Lavoie, B.D., Hogan, E., and Koshland, D. (2002). In vivo dissection of the chromosome condensation machinery: reversibility of condensation distinguishes contributions of condensin and cohesin. *J Cell Biol* 156, 805-815.

Lee, J., Kumagai, A., and Dunphy, W.G. (2003). Claspin, a Chk1-regulatory protein, monitors DNA replication on chromatin independently of RPA, ATR, and Rad17. *Mol Cell* 11, 329-340.

Lee, K.K., and Workman, J.L. (2007). Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 284-295.

Lee, M.H., Reynisdottir, I., and Massague, J. (1995). Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* 9, 639-649.

Leroy, C., Lee, S.E., Vaze, M.B., Ochsenbien, F., Guerois, R., Haber, J.E., and Marsolier-Kergoat, M.C. (2003). PP2C phosphatases Ptc2 and Ptc3 are required for DNA checkpoint inactivation after a double-strand break. *Mol Cell* 11, 827-835.

- Lew, D.J., Dulic, V., and Reed, S.I. (1991). Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. *Cell* *66*, 1197-1206.
- Li, A.M., Watson, A., and Fridovich-Keil, J.L. (2003). Scp160p associates with specific mRNAs in yeast. *Nucleic Acids Res* *31*, 1830-1837.
- Li, C., and Hung Wong, W. (2001). Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biol* *2*, RESEARCH0032.
- Lin, S.Y., Li, K., Stewart, G.S., and Elledge, S.J. (2004). Human Claspin works with BRCA1 to both positively and negatively regulate cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 6484-6489.
- Lindsey-Boltz, L.A., Bermudez, V.P., Hurwitz, J., and Sancar, A. (2001). Purification and characterization of human DNA damage checkpoint Rad complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 11236-11241.
- Lisby, M., Barlow, J.H., Burgess, R.C., and Rothstein, R. (2004). Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. *Cell* *118*, 699-713.
- Lisztwan, J., Marti, A., Sutterluty, H., Gstaiger, M., Wirbelauer, C., and Krek, W. (1998). Association of human CUL-1 and ubiquitin-conjugating enzyme CDC34 with the F-box protein p45(SKP2): evidence for evolutionary conservation in the subunit composition of the CDC34-SCF pathway. *EMBO J* *17*, 368-383.
- Liu, H., Takeda, S., Kumar, R., Westergard, T.D., Brown, E.J., Pandita, T.K., Cheng, E.H., and Hsieh, J.J. (2010). Phosphorylation of MLL by ATR is required for execution of mammalian S-phase checkpoint. *Nature*.
- Lopes, M., Cotta-Ramusino, C., Pelliccioli, A., Liberi, G., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., Newlon, C.S., and Foiani, M. (2001). The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature* *412*, 557-561.
- Lu, X., Liu, J., and Legerski, R.J. (2009). Cyclin E is stabilized in response to replication fork barriers leading to prolonged S phase arrest. *J Biol Chem* *284*, 35325-35337.
- Lucca, C., Vanoli, F., Cotta-Ramusino, C., Pelliccioli, A., Liberi, G., Haber, J., and Foiani, M. (2004). Checkpoint-mediated control of replisome-fork association and signalling in response to replication pausing. *Oncogene* *23*, 1206-1213.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* *389*, 251-260.
- Luo, Y., and Levenson, J.D. (2005). New opportunities in chemosensitization and radiosensitization: modulating the DNA-damage response. *Expert Rev Anticancer Ther* *5*, 333-342.
- Lyapina, S.A., Correll, C.C., Kipreos, E.T., and Deshaies, R.J. (1998). Human CUL1 forms an evolutionarily conserved ubiquitin ligase complex (SCF) with SKP1 and an F-box protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 7451-7456.
- Mailand, N., and Diffley, J.F. (2005). CDKs promote DNA replication origin licensing in human cells by protecting Cdc6 from APC/C-dependent proteolysis. *Cell* *122*, 915-926.

Majka, J., Niedziela-Majka, A., and Burgers, P.M. (2006). The checkpoint clamp activates Mec1 kinase during initiation of the DNA damage checkpoint. *Mol Cell* 24, 891-901.

Malumbres, M., and Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* 30, 630-641.

Marini, F., Pelliccioli, A., Paciotti, V., Lucchini, G., Plevani, P., Stern, D.F., and Foiani, M. (1997). A role for DNA primase in coupling DNA replication to DNA damage response. *EMBO J* 16, 639-650.

Marmorstein, R. (2001). Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 422-432.

Marsellach, F.X., Huertas, D., and Azorin, F. (2006). The multi-KH domain protein of *Saccharomyces cerevisiae* Scp160p contributes to the regulation of telomeric silencing. *J Biol Chem* 281, 18227-18235.

Matsuoka, M., Kato, J.Y., Fisher, R.P., Morgan, D.O., and Sherr, C.J. (1994). Activation of cyclin-dependent kinase 4 (cdk4) by mouse MO15-associated kinase. *Mol Cell Biol* 14, 7265-7275.

Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., 3rd, Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., *et al.* (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316, 1160-1166.

Matsushime, H., Quelle, D.E., Shurtleff, S.A., Shibuya, M., Sherr, C.J., and Kato, J.Y. (1994). D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 14, 2066-2076.

McGowan, C.H., and Russell, P. (1993). Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15. *EMBO J* 12, 75-85.

Melo, J., and Toczyski, D. (2002). A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Curr Opin Cell Biol* 14, 237-245.

Menoyo, A., Alazzouzi, H., Espin, E., Armengol, M., Yamamoto, H., and Schwartz, S., Jr. (2001). Somatic mutations in the DNA damage-response genes ATR and CHK1 in sporadic stomach tumors with microsatellite instability. *Cancer Res* 61, 7727-7730.

Merrick, C.J., Jackson, D., and Diffley, J.F. (2004). Visualization of altered replication dynamics after DNA damage in human cells. *J Biol Chem* 279, 20067-20075.

Mirzoeva, O.K., and Petrini, J.H. (2003). DNA replication-dependent nuclear dynamics of the Mre11 complex. *Mol Cancer Res* 1, 207-218.

Moberg, K.H., Bell, D.W., Wahrer, D.C., Haber, D.A., and Hariharan, I.K. (2001). Archipelago regulates Cyclin E levels in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Nature* 413, 311-316.

Molendini, L., Benassi, M.S., Magagnoli, G., Merli, M., Sollazzo, M.R., Ragazzini, P., Gamberi, G., Ferrari, C., Ballardelli, A., Bacchini, P., *et al.* (1998). Prognostic significance of cyclin expression in human osteosarcoma. *Int J Oncol* 12, 1007-1011.

Moore, E.C., and Hurlbert, R.B. (1966). Regulation of mammalian deoxyribonucleotide biosynthesis by nucleotides as activators and inhibitors. *J Biol Chem* 241, 4802-4809.

- Morgan, D.O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature* 374, 131-134.
- Morgan, D.O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 261-291.
- Morrow, D.M., Tagle, D.A., Shiloh, Y., Collins, F.S., and Hieter, P. (1995). TEL1, an *S. cerevisiae* homolog of the human gene mutated in ataxia telangiectasia, is functionally related to the yeast checkpoint gene MEC1. *Cell* 82, 831-840.
- Mosesso, P., Piane, M., Palitti, F., Pepe, G., Penna, S., and Chessa, L. (2005). The novel human gene aprataxin is directly involved in DNA single-strand-break repair. *Cell Mol Life Sci* 62, 485-491.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.
- Mueller, P.R., Coleman, T.R., Kumagai, A., and Dunphy, W.G. (1995). Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* 270, 86-90.
- Murray, A.W. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116, 221-234.
- Murray, A.W., and Marks, D. (2001). Can sequencing shed light on cell cycling? *Nature* 409, 844-846.
- Mussman, J.G., Horn, H.F., Carroll, P.E., Okuda, M., Tarapore, P., Donehower, L.A., and Fukasawa, K. (2000). Synergistic induction of centrosome hyperamplification by loss of p53 and cyclin E overexpression. *Oncogene* 19, 1635-1646.
- Naiki, T., Shimomura, T., Kondo, T., Matsumoto, K., and Sugimoto, K. (2000). Rfc5, in cooperation with rad24, controls DNA damage checkpoints throughout the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 20, 5888-5896.
- Naiki, T., Wakayama, T., Nakada, D., Matsumoto, K., and Sugimoto, K. (2004). Association of Rad9 with double-strand breaks through a Mec1-dependent mechanism. *Mol Cell Biol* 24, 3277-3285.
- Nakayama, K.I., and Nakayama, K. (2005). Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases. *Semin Cell Dev Biol* 16, 323-333.
- Naldini, L., Blomer, U., Gage, F.H., Trono, D., and Verma, I.M. (1996). Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11382-11388.
- Nghiem, P., Park, P.K., Kim, Y., Vaziri, C., and Schreiber, S.L. (2001). ATR inhibition selectively sensitizes G1 checkpoint-deficient cells to lethal premature chromatin condensation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9092-9097.
- Nilsson, I., and Hoffmann, I. (2000). Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Prog Cell Cycle Res* 4, 107-114.
- Nugent, J.H., Alfa, C.E., Young, T., and Hyams, J.S. (1991). Conserved structural motifs in cyclins identified by sequence analysis. *J Cell Sci* 99 (Pt 3), 669-674.

Nurse, P., and Thuriaux, P. (1980). Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 96, 627-637.

Nyberg, K.A., Michelson, R.J., Putnam, C.W., and Weinert, T.A. (2002). Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet* 36, 617-656.

O'Neill, T., Giarratani, L., Chen, P., Iyer, L., Lee, C.H., Bobiak, M., Kanai, F., Zhou, B.B., Chung, J.H., and Rathbun, G.A. (2002). Determination of substrate motifs for human Chk1 and hCds1/Chk2 by the oriented peptide library approach. *J Biol Chem* 277, 16102-16115.

Obaya, A.J., and Sedivy, J.M. (2002). Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* 59, 126-142.

Obrig, T.G., Culp, W.J., McKeenan, W.L., and Hardesty, B. (1971). The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *J Biol Chem* 246, 174-181.

Ohtsubo, M., and Roberts, J.M. (1993). Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science* 259, 1908-1912.

Okuda, M., Horn, H.F., Tarapore, P., Tokuyama, Y., Smulian, A.G., Chan, P.K., Knudsen, E.S., Hofmann, I.A., Snyder, J.D., Bove, K.E., *et al.* (2000). Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* 103, 127-140.

Olson, E., Nievera, C.J., Liu, E., Lee, A.Y., Chen, L., and Wu, X. (2007). The Mre11 complex mediates the S-phase checkpoint through an interaction with replication protein A. *Mol Cell Biol* 27, 6053-6067.

Ono, T., Fang, Y., Spector, D.L., and Hirano, T. (2004). Spatial and temporal regulation of Condensins I and II in mitotic chromosome assembly in human cells. *Mol Biol Cell* 15, 3296-3308.

Ono, T., Losada, A., Hirano, M., Myers, M.P., Neuwald, A.F., and Hirano, T. (2003). Differential contributions of condensin I and condensin II to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells. *Cell* 115, 109-121.

Osborn, A.J., Elledge, S.J., and Zou, L. (2002). Checking on the fork: the DNA-replication stress-response pathway. *Trends Cell Biol* 12, 509-516.

Page, A.M., and Hieter, P. (1999). The anaphase-promoting complex: new subunits and regulators. *Annu Rev Biochem* 68, 583-609.

Palou, G., Palou, R., Guerra-Moreno, A., Duch, A., Travesa, A., and Quintana, D.G. (2010). Cyclin regulation by the s phase checkpoint. *J Biol Chem* 285, 26431-26440.

Parker, A.E., Van de Weyer, I., Laus, M.C., Oostveen, I., Yon, J., Verhasselt, P., and Luyten, W.H. (1998). A human homologue of the *Schizosaccharomyces pombe* rad1+ checkpoint gene encodes an exonuclease. *J Biol Chem* 273, 18332-18339.

Parker, L.L., and Piwnica-Worms, H. (1992). Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science* 257, 1955-1957.

- Parrilla-Castellar, E.R., Arlander, S.J., and Karnitz, L. (2004). Dial 9-1-1 for DNA damage: the Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) clamp complex. *DNA Repair (Amst)* 3, 1009-1014.
- Parry, D., Bates, S., Mann, D.J., and Peters, G. (1995). Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16INK4/MTS1 tumour suppressor gene product. *EMBO J* 14, 503-511.
- Payton, M., Scully, S., Chung, G., and Coats, S. (2002). Deregulation of cyclin E2 expression and associated kinase activity in primary breast tumors. *Oncogene* 21, 8529-8534.
- Pelliccioli, A., Lucca, C., Liberi, G., Marini, F., Lopes, M., Plevani, P., Romano, A., Di Fiore, P.P., and Foiani, M. (1999). Activation of Rad53 kinase in response to DNA damage and its effect in modulating phosphorylation of the lagging strand DNA polymerase. *EMBO J* 18, 6561-6572.
- Petermann, E., Maya-Mendoza, A., Zachos, G., Gillespie, D.A., Jackson, D.A., and Caldecott, K.W. (2006). Chk1 requirement for high global rates of replication fork progression during normal vertebrate S phase. *Mol Cell Biol* 26, 3319-3326.
- Peters, J.M. (1998). SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis. *Curr Opin Cell Biol* 10, 759-768.
- Petersen, B.O., Lukas, J., Sorensen, C.S., Bartek, J., and Helin, K. (1999). Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *EMBO J* 18, 396-410.
- Pietenpol, J.A., and Stewart, Z.A. (2002). Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* 181-182, 475-481.
- Pihan, G.A., Purohit, A., Wallace, J., Knecht, H., Woda, B., Quesenberry, P., and Doxsey, S.J. (1998). Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res* 58, 3974-3985.
- Plenz, G., Kugler, S., Schnittger, S., Rieder, H., Fonatsch, C., and Muller, P.K. (1994). The human vigilin gene: identification, chromosomal localization and expression pattern. *Hum Genet* 93, 575-582.
- Polyak, K., Kato, J.Y., Solomon, M.J., Sherr, C.J., Massague, J., Roberts, J.M., and Koff, A. (1994). p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 8, 9-22.
- Pommier, Y., Barcelo, J.M., Rao, V.A., Sordet, O., Jobson, A.G., Thibaut, L., Miao, Z.H., Seiler, J.A., Zhang, H., Marchand, C., *et al.* (2006a). Repair of topoisomerase I-mediated DNA damage. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 81, 179-229.
- Pommier, Y., Weinstein, J.N., Aladjem, M.I., and Kohn, K.W. (2006b). Chk2 molecular interaction map and rationale for Chk2 inhibitors. *Clin Cancer Res* 12, 2657-2661.
- Poon, R.Y., and Hunter, T. (1995). Dephosphorylation of Cdk2 Thr160 by the cyclin-dependent kinase-interacting phosphatase KAP in the absence of cyclin. *Science* 270, 90-93.
- Porter, D.C., Zhang, N., Danes, C., McGahren, M.J., Harwell, R.M., Faruki, S., and Keyomarsi, K. (2001). Tumor-specific proteolytic processing of cyclin E generates hyperactive lower-molecular-weight forms. *Mol Cell Biol* 21, 6254-6269.

Prigle, J.R., Broach, J.R., and Jones, E.W. (1993). *The Molecular and Cell Biology of Saccharomyces cerevisiae. Cell Cycle and Cell Biology* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY

Prives, C., and Hall, P.A. (1999). The p53 pathway. *J Pathol* 187, 112-126.

Quade, B.J., Park, J.J., Crum, C.P., Sun, D., and Dutta, A. (1998). In vivo cyclin E expression as a marker for early cervical neoplasia. *Mod Pathol* 11, 1238-1246.

Rajkumar, S.V., and Adjei, A.A. (1998). A review of the pharmacology and clinical activity of new chemotherapeutic agents in lung cancer. *Cancer Treat Rev* 24, 35-53.

Ravi, D., Muniyappa, H., and Das, K.C. (2008). Caffeine inhibits UV-mediated NF-kappaB activation in A2058 melanoma cells: an ATM-PKCdelta-p38 MAPK-dependent mechanism. *Mol Cell Biochem* 308, 193-200.

Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H., and Reed, S.I. (1994). Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol* 14, 1669-1679.

Rouse, J., and Jackson, S.P. (2002a). Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science* 297, 547-551.

Rouse, J., and Jackson, S.P. (2002b). Lcd1p recruits Mec1p to DNA lesions in vitro and in vivo. *Mol Cell* 9, 857-869.

Ryan, A.J., Squires, S., Strutt, H.L., and Johnson, R.T. (1991). Camptothecin cytotoxicity in mammalian cells is associated with the induction of persistent double strand breaks in replicating DNA. *Nucleic Acids Res* 19, 3295-3300.

Saitoh, N., Goldberg, I.G., Wood, E.R., and Earnshaw, W.C. (1994). ScII: an abundant chromosome scaffold protein is a member of a family of putative ATPases with an unusual predicted tertiary structure. *J Cell Biol* 127, 303-318.

Saka, Y., Sutani, T., Yamashita, Y., Saitoh, S., Takeuchi, M., Nakaseko, Y., and Yanagida, M. (1994). Fission yeast cut3 and cut14, members of a ubiquitous protein family, are required for chromosome condensation and segregation in mitosis. *EMBO J* 13, 4938-4952.

Saltz, L.B., Cox, J.V., Blanke, C., Rosen, L.S., Fehrenbacher, L., Moore, M.J., Maroun, J.A., Ackland, S.P., Locker, P.K., Pirogala, N., *et al.* (2000). Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med* 343, 905-914.

Sanchez, Y., Bachant, J., Wang, H., Hu, F., Liu, D., Tetzlaff, M., and Elledge, S.J. (1999). Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms. *Science* 286, 1166-1171.

Sanchez, Y., Desany, B.A., Jones, W.J., Liu, Q., Wang, B., and Elledge, S.J. (1996). Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways. *Science* 271, 357-360.

Sant, M., Aareleid, T., Berrino, F., Bielska Lasota, M., Carli, P.M., Faivre, J., Grosclaude, P., Hedelin, G., Matsuda, T., Moller, H., *et al.* (2003). EURO-CARE-3: survival of cancer patients diagnosed 1990-94--results and commentary. *Ann Oncol* 14 Suppl 5, v61-118.

- Santocanale, C., and Diffley, J.F. (1998). A Mec1- and Rad53-dependent checkpoint controls late-firing origins of DNA replication. *Nature* 395, 615-618.
- Sarkaria, J.N., Busby, E.C., Tibbetts, R.S., Roos, P., Taya, Y., Karnitz, L.M., and Abraham, R.T. (1999). Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Res* 59, 4375-4382.
- Sarkaria, J.N., Tibbetts, R.S., Busby, E.C., Kennedy, A.P., Hill, D.E., and Abraham, R.T. (1998). Inhibition of phosphoinositide 3-kinase related kinases by the radiosensitizing agent wortmannin. *Cancer Res* 58, 4375-4382.
- Sauer, K., Knoblich, J.A., Richardson, H., and Lehner, C.F. (1995). Distinct modes of cyclin E/cdc2c kinase regulation and S-phase control in mitotic and endoreduplication cycles of *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev* 9, 1327-1339.
- Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite, L., Tagle, D.A., Smith, S., Uziel, T., Sfez, S., *et al.* (1995). A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 268, 1749-1753.
- Scuderi, R., Palucka, K.A., Pokrovskaja, K., Bjorkholm, M., Wiman, K.G., and Pisa, P. (1996). Cyclin E overexpression in relapsed adult acute lymphoblastic leukemias of B-cell lineage. *Blood* 87, 3360-3367.
- Schmidt, C., Henkel, B., Poschl, E., Zorbas, H., Purschke, W.G., Gloe, T.R., and Muller, P.K. (1992). Complete cDNA sequence of chicken vigilin, a novel protein with amplified and evolutionary conserved domains. *Eur J Biochem* 206, 625-634.
- Schulman, B.A., Carrano, A.C., Jeffrey, P.D., Bowen, Z., Kinnucan, E.R., Finnin, M.S., Elledge, S.J., Harper, J.W., Pagano, M., and Pavletich, N.P. (2000). Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex. *Nature* 408, 381-386.
- Schwob, E., and Nasmyth, K. (1993). CLB5 and CLB6, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 7, 1160-1175.
- Seidler, J., Zinn, N., Haaf, E., Boehm, M.E., Winter, D., Schlosser, A., and Lehmann, W.D. (2010). Metal ion-mobilizing additives for comprehensive detection of femtomole amounts of phosphopeptides by reversed phase LC-MS. *Amino Acids*.
- Serrano, M., Hannon, G.J., and Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366, 704-707.
- Sgambato, A., Camerini, A., Pani, G., Cangiano, R., Faraglia, B., Bianchino, G., De Bari, B., Galeotti, T., and Cittadini, A. (2003). Increased expression of cyclin E is associated with an increased resistance to doxorubicin in rat fibroblasts. *Br J Cancer* 88, 1956-1962.
- Shechter, D., Costanzo, V., and Gautier, J. (2004). ATR and ATM regulate the timing of DNA replication origin firing. *Nat Cell Biol* 6, 648-655.
- Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13, 1501-1512.

Shevchenko, A. (2001). Evaluation of the efficiency of in-gel digestion of proteins by peptide isotopic labeling and MALDI mass spectrometry. *Anal Biochem* 296, 279-283.

Shieh, S.Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y., and Prives, C. (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev* 14, 289-300.

Shieh, S.Y., Taya, Y., and Prives, C. (1999). DNA damage-inducible phosphorylation of p53 at N-terminal sites including a novel site, Ser20, requires tetramerization. *EMBO J* 18, 1815-1823.

Shiloh, Y. (2001). ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev* 11, 71-77.

Shim, E.Y., Hong, S.J., Oum, J.H., Yanez, Y., Zhang, Y., and Lee, S.E. (2007). RSC mobilizes nucleosomes to improve accessibility of repair machinery to the damaged chromatin. *Mol Cell Biol* 27, 1602-1613.

Shin, C.G., and Snapka, R.M. (1990). Exposure to camptothecin breaks leading and lagging strand simian virus 40 DNA replication forks. *Biochem Biophys Res Commun* 168, 135-140.

Shirahige, K., Hori, Y., Shiraishi, K., Yamashita, M., Takahashi, K., Obuse, C., Tsurimoto, T., and Yoshikawa, H. (1998). Regulation of DNA-replication origins during cell-cycle progression. *Nature* 395, 618-621.

Sickmann, A., and Meyer, H.E. (2001). Phosphoamino acid analysis. *Proteomics* 1, 200-206.

Sidorova, J.M., and Breeden, L.L. (2003). Rad53 checkpoint kinase phosphorylation site preference identified in the Swi6 protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 23, 3405-3416.

Sikorski, R.S., and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.

Singer, J.D., Gurian-West, M., Clurman, B., and Roberts, J.M. (1999). Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells. *Genes Dev* 13, 2375-2387.

Skowyra, D., Craig, K.L., Tyers, M., Elledge, S.J., and Harper, J.W. (1997). F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* 91, 209-219.

Smith, M.L., and Seo, Y.R. (2000). Sensitivity of cyclin E-overexpressing cells to cisplatin/taxol combinations. *Anticancer Res* 20, 2537-2539.

Smith, P.J., Makinson, T.A., and Watson, J.V. (1989). Enhanced sensitivity to camptothecin in ataxia-telangiectasia cells and its relationship with the expression of DNA topoisomerase I. *Int J Radiat Biol* 55, 217-231.

Sogo, J.M., Lopes, M., and Foiani, M. (2002). Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science* 297, 599-602.

Solomon, M.J., Glotzer, M., Lee, T.H., Philippe, M., and Kirschner, M.W. (1990). Cyclin activation of p34cdc2. *Cell* 63, 1013-1024.

- Spruck, C.H., Strohmaier, H., Sangfelt, O., Muller, H.M., Hubalek, M., Muller-Holzner, E., Marth, C., Widschwendter, M., and Reed, S.I. (2002). hCDC4 gene mutations in endometrial cancer. *Cancer Res* 62, 4535-4539.
- Spruck, C.H., Won, K.A., and Reed, S.I. (1999). Deregulated cyclin E induces chromosome instability. *Nature* 401, 297-300.
- St Croix, B., Florenes, V.A., Rak, J.W., Flanagan, M., Bhattacharya, N., Slingerland, J.M., and Kerbel, R.S. (1996). Impact of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 on resistance of tumor cells to anticancer agents. *Nat Med* 2, 1204-1210.
- Stokes, M.P., Rush, J., Macneill, J., Ren, J.M., Sprott, K., Nardone, J., Yang, V., Beausoleil, S.A., Gygi, S.P., Livingstone, M., *et al.* (2007). Profiling of UV-induced ATM/ATR signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19855-19860.
- Strunnikov, A.V., Hogan, E., and Koshland, D. (1995). SMC2, a *Saccharomyces cerevisiae* gene essential for chromosome segregation and condensation, defines a subgroup within the SMC family. *Genes Dev* 9, 587-599.
- Su, T.T., and O'Farrell, P.H. (1998). Chromosome association of minichromosome maintenance proteins in *Drosophila* endoreplication cycles. *J Cell Biol* 140, 451-460.
- Takemoto, A., Kimura, K., Yokoyama, S., and Hanaoka, F. (2004). Cell cycle-dependent phosphorylation, nuclear localization, and activation of human condensin. *J Biol Chem* 279, 4551-4559.
- Takemura, H., Rao, V.A., Sordet, O., Furuta, T., Miao, Z.H., Meng, L., Zhang, H., and Pommier, Y. (2006). Defective Mre11-dependent activation of Chk2 by ataxia telangiectasia mutated in colorectal carcinoma cells in response to replication-dependent DNA double strand breaks. *J Biol Chem* 281, 30814-30823.
- Tercero, J.A., and Diffley, J.F. (2001). Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature* 412, 553-557.
- Tercero, J.A., Longhese, M.P., and Diffley, J.F. (2003). A central role for DNA replication forks in checkpoint activation and response. *Mol Cell* 11, 1323-1336.
- Thelen, M.P., Venclovas, C., and Fidelis, K. (1999). A sliding clamp model for the Rad1 family of cell cycle checkpoint proteins. *Cell* 96, 769-770.
- Thiriet, C., and Hayes, J.J. (2005). Chromatin in need of a fix: phosphorylation of H2AX connects chromatin to DNA repair. *Mol Cell* 18, 617-622.
- Tobey, R.A., Anderson, E.C., and Petersen, D.F. (1967). The effect of thymidine on the duration of G1 in Chinese hamster cells. *J Cell Biol* 35, 53-59.
- Travesa, A., Duch, A., and Quintana, D.G. (2008). Distinct phosphatases mediate the deactivation of the DNA damage checkpoint kinase Rad53. *J Biol Chem* 283, 17123-17130.
- Tsimaratou, K., Kletsas, D., Kastrinakis, N.G., Tsantoulis, P.K., Evangelou, K., Sideridou, M., Lontos, M., Poulias, I., Venere, M., Salmas, M., *et al.* (2007). Evaluation of claspin as a proliferation marker in human cancer and normal tissues. *J Pathol* 211, 331-339.

Tsurimoto, T., and Stillman, B. (1991). Replication factors required for SV40 DNA replication in vitro. I. DNA structure-specific recognition of a primer-template junction by eukaryotic DNA polymerases and their accessory proteins. *J Biol Chem* 266, 1950-1960.

Ünlü, M., Morgan, M.E., and Minden, J.S. (1997). Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18, 2071-2077.

Usui, T., Ogawa, H., and Petrini, J.H. (2001). A DNA damage response pathway controlled by Tel1 and the Mre11 complex. *Mol Cell* 7, 1255-1266.

van Attikum, H., and Gasser, S.M. (2005). The histone code at DNA breaks: a guide to repair? *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 757-765.

van den Bosch, M., Bree, R.T., and Lowndes, N.F. (2003). The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes. *EMBO Rep* 4, 844-849.

Vaugeois, J.M. (2002). Signal transduction: positive feedback from coffee. *Nature* 418, 734-736.

Venclovas, C., and Thelen, M.P. (2000). Structure-based predictions of Rad1, Rad9, Hus1 and Rad17 participation in sliding clamp and clamp-loading complexes. *Nucleic Acids Res* 28, 2481-2493.

Walter, J., and Newport, J. (2000). Initiation of eukaryotic DNA replication: origin unwinding and sequential chromatin association of Cdc45, RPA, and DNA polymerase alpha. *Mol Cell* 5, 617-627.

Wall, M.E., Wani, M.C., Cook, C.E., Palmer, K.H., McPhail, A.I., and Sim, G.A. (1966). Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *camptotheca acuminata*. *Journal of the American Chemical Society* 88, 3888-3890.

Wang, H., Wang, X., Zhou, X.Y., Chen, D.J., Li, G.C., Iliakis, G., and Wang, Y. (2002a). Ku affects the ataxia and Rad 3-related/CHK1-dependent S phase checkpoint response after camptothecin treatment. *Cancer Res* 62, 2483-2487.

Wang, J.L., Wang, X., Wang, H., Iliakis, G., and Wang, Y. (2002b). CHK1-regulated S-phase checkpoint response reduces camptothecin cytotoxicity. *Cell Cycle* 1, 267-272.

Wang, Q., Zhang, Z., Blackwell, K., and Carmichael, G.G. (2005). Vigilins bind to promiscuously A-to-I-edited RNAs and are involved in the formation of heterochromatin. *Curr Biol* 15, 384-391.

Wang, S.W., Toda, T., MacCallum, R., Harris, A.L., and Norbury, C. (2000a). Cid1, a fission yeast protein required for S-M checkpoint control when DNA polymerase delta or epsilon is inactivated. *Mol Cell Biol* 20, 3234-3244.

Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S.J., and Qin, J. (2000b). BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* 14, 927-939.

Weaver, E.J., Kovatich, A.J., and Bibbo, M. (2000). Cyclin E expression and early cervical neoplasia in ThinPrep specimens. A feasibility study. *Acta Cytol* 44, 301-304.

Weber, V., Wernitznig, A., Hager, G., Harata, M., Frank, P., and Wintersberger, U. (1997). Purification and nucleic-acid-binding properties of a *Saccharomyces cerevisiae* protein involved in the control of ploidy. *Eur J Biochem* 249, 309-317.

Weiss, R.S., Matsuoka, S., Elledge, S.J., and Leder, P. (2002). Hus1 acts upstream of chk1 in a mammalian DNA damage response pathway. *Curr Biol* 12, 73-77.

Wimmel, A., Lucibello, F.C., Sewing, A., Adolph, S., and Muller, R. (1994). Inducible acceleration of G1 progression through tetracycline-regulated expression of human cyclin E. *Oncogene* 9, 995-997.

Wintersberger, U., Kuhne, C., and Karwan, A. (1995). Scp160p, a new yeast protein associated with the nuclear membrane and the endoplasmic reticulum, is necessary for maintenance of exact ploidy. *Yeast* 11, 929-944.

Wolowicz, D., Benchaib, M., Pernas, P., Deviller, P., Souchier, C., Rimokh, R., Felman, P., Bryon, P.A., and Ffrench, M. (1995). Expression of cell cycle regulatory proteins in chronic lymphocytic leukemias. Comparison with non-Hodgkin's lymphomas and non-neoplastic lymphoid tissue. *Leukemia* 9, 1382-1388.

Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701-704.

Yada, M., Hatakeyama, S., Kamura, T., Nishiyama, M., Tsunematsu, R., Imaki, H., Ishida, N., Okumura, F., Nakayama, K., and Nakayama, K.I. (2004). Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. *EMBO J* 23, 2116-2125.

Yamamoto, A., Guacci, V., and Koshland, D. (1996). Pds1p, an inhibitor of anaphase in budding yeast, plays a critical role in the APC and checkpoint pathway(s). *J Cell Biol* 133, 99-110.

Yang, Q., Sakurai, T., Yoshimura, G., Takashi, Y., Suzuma, T., Tamaki, T., Umemura, T., Nakamura, Y., Nakamura, M., Utsunomiya, H., *et al.* (2000). Overexpression of p27 protein in human breast cancer correlates with in vitro resistance to doxorubicin and mitomycin C. *Anticancer Res* 20, 4319-4322.

Yeh, E.S., Lew, B.O., and Means, A.R. (2006). The loss of PIN1 deregulates cyclin E and sensitizes mouse embryo fibroblasts to genomic instability. *J Biol Chem* 281, 241-251.

Yu, H., Peters, J.M., King, R.W., Page, A.M., Hieter, P., and Kirschner, M.W. (1998a). Identification of a cullin homology region in a subunit of the anaphase-promoting complex. *Science* 279, 1219-1222.

Yu, Q., Rose, J.H., Zhang, H., and Pommier, Y. (2001). Antisense inhibition of Chk2/hCds1 expression attenuates DNA damage-induced S and G2 checkpoints and enhances apoptotic activity in HEK-293 cells. *FEBS Lett* 505, 7-12.

Yu, Z.K., Gervais, J.L., and Zhang, H. (1998b). Human CUL-1 associates with the SKP1/SKP2 complex and regulates p21(CIP1/WAF1) and cyclin D proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11324-11329.

Yuan, J.S., Reed, A., Chen, F., and Stewart, C.N., Jr. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 7, 85.

Zariwala, M., Liu, J., and Xiong, Y. (1998). Cyclin E2, a novel human G1 cyclin and activating partner of CDK2 and CDK3, is induced by viral oncoproteins. *Oncogene* 17, 2787-2798.

Zhao, X., Muller, E.G., and Rothstein, R. (1998). A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Mol Cell* 2, 329-340.

Zhou, B.B., and Elledge, S.J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408, 433-439.

Zhou, G., Wang, D., Yang, S., Xu, X., Ren, Y., Shao, Z., Jiang, M., Tian, Y., Hao, F., Li, S., *et al.* (2002). Studies on the two-photon pumped upconverted fluorescence and superradiance of a new organic dye material in solutions. *Appl Opt* 41, 6371-6374.

Zhou, Z., and Elledge, S.J. (1992). Isolation of crt mutants constitutive for transcription of the DNA damage inducible gene RNR3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 131, 851-866.

Zou, L., Cortez, D., and Elledge, S.J. (2002). Regulation of ATR substrate selection by Rad17-dependent loading of Rad9 complexes onto chromatin. *Genes Dev* 16, 198-208.

Zou, L., and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 300, 1542-1548.

Zou, L., and Stillman, B. (2000). Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase. *Mol Cell Biol* 20, 3086-3096.

Abreviatures

1C	un contingut de DNA
2C	dos contingut de DNA
2D-DIGE	electroforesi bidimensional diferencial en gel
APC	complex promotor de l'anafase
ATM	proteïna mutada en l'ataxia telangiectasia
ATP	adenosine trifosfat
ATR	proteïna relacionada amb ATM i Rad3p
BSA	sèrum fetal boví
cDNA	DNA còpia
CDK	quinasa dependent de ciclina
CHK1	quinasa <i>checkpoint</i> 1
CHK2	quinasa <i>checkpoint</i> 2
CHX	cicloheximida
CPT	camptotecina
cRNA	RNA còpia
Cy	cianina
dATP	desoxiadenosina trifosfat
dCTP	desoxicitosina trifosfat
dGTP	desoxiguanina trifosfat
DMEM	<i>dubecco's modified eagle medium</i>
DMSO	dimetilsulfòxid
DNA	àcid desoxiribonuclèic
dNDP	desoxinucleòtid trifosfat
dsDNA	DNA de cadena doble
dTTP	desoxitimina trifosfat
EDTA	àcid etilendiaminotetraacètic
FACS	citometria de flux activada per fluorescència
HA	hemaglutinina
HU	hidroxiurea
IC₅₀	concentració inhibidora 50%
IG	índex de gemmació
IPA	<i>Ingenity pathway analysis</i>
Kb	quilobase
Kda	quilodaltons
LB	medi de cultiu Luria Beltrani
MCM	complex manteniment minicromosoma
MTT	bromur de 3-(4,5-Dimetil-2-Tiazolil)-2,5-difeniltetrazoil
NDP	nucleòtid difosfat
PBS	tampó fosfat salí
PCR	reacció de polimeració en cadena
PEG	polietilenglicol
RFC	factor de replicació C
RMA	anàlisi robust del microxip
RNA	àcid ribonuclèic
RNR	ribonucleotidil reductasa
RPA	proteïna de replicació A
rRNA	RNA ribosòmic
SCF	Complex Skp-Cullin-F-Box
Ser	serina
SMC	manteniment de l'estructura de la cromatina
ssDNA	DNA de cadena senzilla
TBS	tampó TRIS salí
TCA	àcid tricloracètic
Thr	treonina

ABREVIATURES

WB
YPD

western blot
medi ric amb dextrosa

Agraïments

Primer, voldria agrair a Simo Schwartz la possibilitat que em va donar de fer una tesi doctoral, jo venia de la primera decepció del món laboral perquè no havia aconseguit una beca en un altre grup... i aquí va començar el camí cap el futur que sempre havia somiat. La veritat és que la cosa s'ha complicat força, però malgrat que semblava que mai arribaria aquest dia, per fi ja hi som. Després de totes les coses difícils que han passat crec que irremediablement els bons moments i les mil coses que han fet que creixi com a persona han golejat.

Al David G. Quintana que li hauria de dir... ja saps tot el que penso de tu i la nostra relació, per bé o per mal a mi no em van concedir el don de la mentida. Ets el meu pare professional, has estat a la poïata amb mi ensenyant-me gairebé tot el que a dia d'avui sé de ciència. Gràcies per haver estat dur amb mi quan ha calgut i haver aconseguit que l'orgull que tinc pugui tenir una finalitat bona, la superació. Gracies per fer-me estimar el cicle cel·lular i el checkpoint.

Oriol, moltes gràcies per haver-me fet la tesi més fàcil. Te tingut de profe tant a la carrera com durant el doctorat. Per mi ha estat un orgull conèixer-te, ets una gran persona. Qui m'hauria dit el primer dia que vas entrar a classe de Genètica Molecular que m'acompanyaries en aquest viatge tant únic. Espero que gaudeixis molt la vida a partir d'ara. Que tinguis moltíssima sort!!

Ara haig de passar als agraïments dels companys... el problema és que hi ha tants que hauré de resumir... Començant pel CIBBIM i mirant cap enrere... Hafid gràcies per les xerrades dels meus primers dies a la cueva, molta política, religió, cultura... Ets una gran persona. Enric espero en un temps no massa llunyà vivim a la mateixa ciutat, si en aquesta illa gran situada en el nord. La veritat que al principi sempre pensava que et feia nosa, però després del temps m'has demostrat que era una paranoia meva. Senyora Dávalos gràcies per la teva sobrietat i ser el membre del grup que tot ho equilibrava, jolin és que eres la noieta entre tant home descerebrat!! Laura G^a, gràcies per cuidar-me tantíssim al llarg d'aquests anys, has estat el meu recolzament, jo crec que sense tu en algun moment m'hauria marxat corrents i sense mirar enrere. Gràcies per haver estat en algun dels pitjors moments que recordo i per haver-me escoltat i aconsellat a l'hora de dinar. Isabel, m'has ajudat molt, sempre m'he sentit molt recolzat per tu, encara me'n recordo del primer dia que et vaig veure a la poïata a la planta 14, com han canviat les coses. Durant la segona edat del CIBBIM van aparèixer tot una sèrie de personatges que mai oblidaré i que espero que siguem amics per sempre, com deia la cançó... Romerito ets el p... crack, l'home que va fer que tots els companys fóssim un de sol i que m'aixequés cada matí amb ganes d'arribar a la feina. Joselito!!!! Que difícil que va ser el principi i quin sentit de la superació que has demostrat, crec que si creus més en tu seràs capaç d'aconseguir el que vulguis. Julito!! Sort que finalment ens vam conèixer en el CIBBIM, ets de les persones que més aprecio... quantes xerrades profundes, piques, cerveses,... hem compartit!! Àgueda, no se que dir-te, tinc que agrair-te tant que no se per on començar, gràcies per les correccions, les ajudes de tota mena, gràcies per ser amiga i saber imposar una mica de criteri en els meus moments d'ofuscació. Espero que malgrat que estiguis en el Lado Oscuro mai t'oblidis de nosaltres. I com no, donaré gràcies a aquella ampolla de LB que et va ficar a la meua vida. Julian, crack, més que crack, des de que vas marxar, això no es el mateix, ja ningú vol anar a veure l'etapa reina del Tour amb mi... t'estimo molt. Francesco, espero que avui apareguis per la sala, perquè aquesta no te la perdonaria. Et desitjo moltíssima sort que ets dels que se la mereixen, ets gran. Renu, gràcies per haver deixat tot a l'Índia i haver-nos permès conèixer-te, ets una persona que mereixes molt la pena. Joan, que dir-te, ja saps que per mi ets el millor científic que tinc a prop, gràcies pels consells i, tot i la teva negativitat perpètua, haver-me pujat mil vegades la moral. No et desitjaré sort, no la necessites, només continua creixent. Diego, cada dia que passa t'aprecio més, ets l'altra crack de Metabòlica. Segueix així. David A., el meu petit deixeble del checkpoint, gràcies per la paciència que m'has demostrat i pel teu ajut. Ets de les persones més llestes que conec. No et preocupis, que sempre et demanaré la teua opinió. Emmita, Rocco, Paulo, pensava que només estaria uns mesos amb vosaltres i al final pràcticament llegim la tesi el mateix dia. Sou gent genial, les noves animes del CIBBIM, no

deixeu que res torci la vostra personalitat. Silvia, Aroa (Zipi y Zape, me encanta) gràcies pels bons moments, per les xerrades, per la sobrietat, per fer els dies més distesos. Ibane and company, moltes gràcies per l'ajuda que m'heu brindat. Molta sort en la nano-aventura que heu començat, espero que tot us vagi molt bé. Mario, tu como si fossis del CIBBIM! Gràcies per preocupar-te sempre de nosaltres, pels teus consells, per ser amic. Que vagi tot molt bé en la teva nova etapa que t'ho mereixes. Cris, t'aprecio molt, gràcies per tants moments d'esbarjo i confiança. Lagares, és una sort haver-te conegut, tot i que al principi no em queies gaire bé ;p... Gaudeix molt de la ciència en el teu nou lab, arribaràs lluny. A la gent que porta al lab menys temps, Sarah i Lucia C, dir-vos que em sembleu molt bones persones i us desitjo tota la sort del món.

Ara vaig pels de la UAB amb els que també he compartit gran part del treball escrit aquí dalt. Primer vull destacar l'Alba i l'Anna, l'any que vaig passar al vostra costat va ser immens, és com l'interlude de una cançó... Sortir de la rutina... Gràcies per haver-me ajudat a adaptar-me, a conèixer el llevat, per ser les meves amigues... M'ho vaig passar en gran. Glòria, gràcies per ajudar-me acabar la tesi, per suportar les meves rajades quan el manuscrit no avançava... i perdona per haver estat un tant desordenat pel lab, ja se que no ho toleres gaire ;) Roger, amb tu he coincidit menys, però el temps suficient per adonar-me que sobre les espatlles tens un cap molt ben moblat, si tens paciència sé que arribaràs lluny, ets una molt bona persona, sort! Cateninos i catenines, sou moltíssims, a més crec que us he conegut pràcticament a tots els que heu passat. Moltes gràcies per ajudar-me tantes vegades. A tota la resta del departament de Biofísica, gràcies per haver-me acollit, i haver fet que sigui molt fàcil les meves dos estades amb vosaltres!!

Javi, que t'haig de dir, ja som amics des de fa anys, t'agraeixo que m'hagis ajudat de forma desinteressada en un munt de coses i haver-me donat tant savis consells. Gràcies per ser tant tranquil i reflexiu, és necessita gent així a prop. Charly P, ja saps que em fa molta pena que marxessis cap a Madrid, ara ja no tinc amb qui anar a prendre alguna cosa després de la feina i poder xerrar de ciència o frikades!! Espero veure't aviat!! Que tot et vagi molt bé, em tens aquí pel que necessitis.

Per penúltim vull agrair els meus amics de l'ànima, el Charly i la Meli, sento que aquests últims anys hagi estat tant difícil veure'ns, això canviarà. De totes maneres sempre estaré disponible pel que necessiteu. Charp, ets el meu amic de sempre i, tot i que les coses evolucionen, espero que sempre hagi un forat per estar junts. Patric, que dir-te. No oblidaré mai quan vivies a casa meva i m'esperaves despertar fins les 5 del matí que jo sortia de fer experiments de cicle. Has estat una ajuda insuperable aquests últims anys. T'estimo molt. Silvia i Anita, gràcies per compartir una part de la meva vida i gràcies per haver-me ajudat en moments del meu doctorat. Sou persones màgiques, feu el que sigui per no canviar. Carles, estic cansat de tenir-te sempre donant voltes pel món, ja va sent hora que tornis a estar a prop, el meu millor amic de la carrera, gràcies per haver-me cuidat com a un germà quan vaig viure a Girona. Primooooo!!!! Juanmita, que dir a la persona que millor m'ha conegut i m'ha sabut tractar? T'estimo com si fossis el meu germà. Gràcies per fer-me riure d'aquesta manera incansable. Utri, un altre que marxa cap a Madrid, no sé si hi haurà una plaga. Espero que ens anem veient els caps de setmana i sempre quedarà el meu cumple. Espero que no canviïs mai. A las gentes asturianas y andaluzas que han ido entrando en mi vida en los últimos tiempos, gracias por haberme aceptado entre vosotros, con lo rancio que soy!!! Sois gente de p... madre!!

També voldria agrair a tota la meva família (Frechosos, Salas, Morenos y Centelles) la paciència que han tingut en aquests anys, els moments de nervis, el no veure'ns sovint,... Això canviarà!! Haig de destacar a ma mare, sin ti no habría podido llegar tan lejos, bueno yo creo que ni a la esquina de nuestra casa. Me acuerdo de aquellos tiempos, lejanos ya, en que llegabas a las tantas de trabajar y aun tenías tiempo y fuerzas para ponerte con tu hijo pequeño para ayudarlo a hacer los deberes del cole. Aquel fue el momento más importante de inflexión en mi vida que, ya para siempre, me ha empujado hacia mi meta. Gracias por haber hecho que tenga tantísimas experiencias en mi infancia, siempre lo has hecho todo por mi. No hay palabras para agradecerte todo y tanto. Mama te quiero, lo sabes y por mucho que pase, jamás cambiará. També vull destacar els meus avis, Ricardo y Conchi, que han ajudat

a forjar-me tal qual soc avui en dia. Ja no són entre nosaltres, però mai de la vida els oblidaré, em van cuidar com veritables pares. Os querré a través de la eternidad y de las dimensiones!! Antonio, moltes gràcies per haver-te esforçat tant en entendre'm, ja sé que puc ser difícil. Vull que sàpigues que formes part del meu pensament, espero tenir-te sempre a prop. Papa, espero que avui estiguis amb mi, sinó aquest dia no serà el mateix. Espero poder passar més temps amb vosaltres a partir d'ara. Henar, Gerard i Maria, gràcies per tenir-me sempre als vostres pensaments i no deixar que ens disgreguem. Us estimo molt a tots quatre.

Per acabar, vull agrair a una de les persones que definitivament a fet un esforç sobre humà perquè jo estigui davant de tots vosaltres, a punt d'aconseguir aquest títol que tant s'ha suat. Lucia, gracias por tanta paciencia en estos tres años, por haber aguantado tantos momentos difíciles, enfados, nervios,... Por haberme ayudado, anteponiéndome a tu tesis y a tantas otras cosas. Por tener ese carácter y esa alegría tan necesaria que hace que todo el mundo caiga rendido ante ti. Gracias por haberte quedado conmigo en mis momentos de desespero y desilusión, y haber conseguido arrancarme una sonrisa por imposible que pareciese. Tengo que decirte que la mitad de esta tesis y este título son tuyos, creo que sin tu apoyo hubiera caído y no me hubiera levantado. Ahora me toca a mi devolverte lo que has invertido en mi. Espero que salgamos de esto juntos y volaremos a conocer el mundo. Niña te quiero!!!