Implicació de p27 i PCAF en la regulació de la transcripció

Anna Perearnau Garcia

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (**www.tdx.cat**) service and by the UB Digital Repository (**diposit.ub.edu**) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

TESI DOCTORAL

IMPLICACIÓ DE p27 i PCAF EN LA REGULACIÓ DE LA TRANSCRIPCIÓ

ANNA PEREARNAU GARCIA

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Imatges portada i apartats: Experiments *wound healing*, cèl·lules MCF-7, confocal SP5, Anna Perearnau Garcia.

Barcelona, Octubre 2014

Departament Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències

Programa Doctoral de Biomedicina

Facultat de Medicina

Universitat de Barcelona

IMPLICACIÓ DE p27 i PCAF EN LA REGULACIÓ DE LA TRANSCRIPCIÓ

Tesi presentada per

Anna Perearnau Garcia

Per optar al grau de

Doctora en Biomedicina

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció del Dr. Bachs Valldeneu i la Dra. Mª Jesús Pujol Sobrevía, en el Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona.

A la family

Al Ferran

Doncs això ja s'acaba…Vaig començar el doctorat ara fa 4 anys pensant que eren molts anys, i resulta que al final han passat volant. Costa de creure, perquè la investigació mai s'acaba…

Des dels meus inicis al grup i gràcies a les ensenyances de la Maria, vaig agafar el relleu de la 'historia' de PCAF i p27. Què petita que em recordo, allà a la poiata dels bacteris, aprenent com anaven les IPs i tots els truquillos del laboratori. Aprenent a que res surt a la primera (només al final de la Tesi), a que SEMPRE cal repetir-ho tot, i a que no passa res si la cagues...a tothom li ha passat abans que tu, i de pas així se't queda gravat o encara millor, potser descobriràs quelcom interessant.

La cosa va anar millorant, i encara que al principi escoltava les discussions científiques durant el dinar, entre tuppers, cafès, i al lab entre campanes i revelats, pensant en quant en sabien de tot i que poc en sabia jo...vaig anar descobrint que la paciència (sisi, just del que jo no en tenia gaire) i la perseverança són la clau en la ciència, i em vaig adonar que moltes optimitzacions de protocols han sorgit gràcies a aquestes discussions informals.

Perquè sense les vostres idees, experiència i consells molts dels experiments d'aquesta Tesi no haguessin estat possibles. Per això, vull agrair a tots els membres del meu grup, per odre d'aparició en la meva vida, la seva inestimable ajuda:

Oriol: gràcies per donar-me aquesta oportunitat, ha estat una experiència extraordinària. Gràcies per la llibertat i confiança que m'has donat sobre la meva investigació, per discutir els resultats i decidir els següents passos a seguir, i per sempre veure amb bons ulls qualsevol resultat contrarestant el meu escepticisme inicial. Gràcies per anomenar-me Doctora Perearnau des del primer dia i per les teves bromes quotidianes.

Atilla: company de màster i de 4 anys de Tesi compartint la p27 i els ChIP-seqs. Has sido un muy buen compañero de Tesi. Me encantan tus momentos de 'cantante' con rock fm, tus momentos de madarlo todo a la mierda en turco, y que siempre te apuntas a lo que te echen.

Ignasi: quasi no t'encordaràs però quan feia el màster vas ser tu qui em va ensenyar. La biotecnologia mola!

Maria i **Xus**: un bon equip, em veu ensenyar com anava tot en el lab, que no és poc, i el 'fabulós' mòn de PCAF i les acetilacions, gràcies per la vostra ajuda!

Miriam: la superexperta en IPs, escriptora de còmics i productora d'embrions. M'encanten els teus chistes malos però sobretot com te'n rius!

Serena: cuando entendí el serenuzzo también te entendí a ti. Grácias por tus enseñanzas de la ChÍPe, la CoIP i por compartir classes tanto fuesen de cómo pinchar a un ratón o de aquagym.

Judit: una peça molt important del grup, encara que no parli de p27 ;) Gràcies per les teves converses tant científiques com no (Mendeley és Dios).

Martina: Companya de bahia, instructora de moda i decoració, i d'excursions a l'estabulari. Encara que amb l'Edurne t'intentessim portar pel mal camí científic, la teva rectitud no ho ha permés ;). Ah, i demà toquen MEFs, eh Atilla!

Edurne: Posdoc, posdoc! Sempre darrere meu...Gràcies per respondre a tooootes les meves preguntes, que no són poques, per fer-me riure molt i ser una Puti tots els dies des de que vas arribar!

Neus: Gràcies per les converses sobre els nostres amics p27, PCAF i ETS, són fabuloses per donar-hi voltes (i també per compartir penes)!

Als *Highly motivated* estudiants (Gabri, Juancho, Carla i Jonathan) i la nova doctoranda Laura, el futur de la ciéncia està assegurat amb vosaltres!

També voldria agraïr-li a la resta dels companys de lab per la seva ajuda i els moments viscuts:

A les Pombe,

Marta i Alba: M'agradava la passió de les vostres discussions pombianes en les que no entenia ni la meitat... **Alba**, sempre seràs la Golden Queen. **Euge**: la meva twin! Gràcies pel teu bon humor i la teva locura. Perquè no hem coincidit en gaires protocols que sinó m'haguessis sigut molt útil Eugeinstein! **Tula**: Grácias por escucharme siempre, sobretodo en este último periodo y por tus firmes opiniones. **David**: grácias por tus bromas y tu salero.

A les Neus,

Llopis: la paraula ciència i festa et defineixen. M'has inpirat en el lab. **Carles**: sempre tant atent i amb horaris atempestius. **Amaia**: Bajais a hacer un café?. En una hora comemos;) **Noe**: esa chica de Huesca! Que bién que llegaste para compartir nuestras convicciones científicas ;) **Edu**: ànims amb el doctorat!

Sara: succesora de l'Eulàlia, gràcies per preocupar-te de nosaltres i consultar-nos sempre. Per ajudar-me amb les pràctiques, i per riure't tant!

Gràcies a la resta de gent de la Facultat, que en algun moment o altre, coneixent-me o no, han dedicat part del seu temps a ajudar-me, explicant-me com funciona algun aparell o simplement resolent qualsevol problemilla que se'm planteges.

També he de donar les gràcies a les Bionenes, pel seu suport moral durant aquests anys. En especial menció a la Guio: doctoranda i excompanya de pis, que ha seguit tota l'evolució científica d'aquesta Tesi. A por el Science!

A més vull agrair-li a la gent no-científica el seu interès per entendre al que em dedico encara que els hi soni a xino:

A les Xurris del Cole i a les Pimpollos del CIC.

A la meva family, als meus pares per fer-me sentir orgullosa del que faig. Al meu germanet i a la Marta per preocupar-se de com van els experiments.

A la resta de la família, en especial als avis, pel seu interès i curiositat. I a la Clara, per ajudar-me en el disseny d'aquesta Tesi, perquè l'art no està renyit amb la ciència!

A la família Pijoan, pel vostre suport incondicional.

I finalment al Ferran, per aguantar-me en cada etapa de la Tesi, des dels moments eufòrics als frustrants, per donar-me en tot moment el teu suport i consell. Gràcies per fer-ho tot molt fàcil!

Anna

INTRODUCCIÓ 1

1. El cicle cel·lular ... 3
1.1. Regulació del cicle cel·lular ... 4

2. Proteïnes inhibidores de CDKs (CKIs) ... 6
2.1. p27 ... 7
- p27, dualitat en la regulació del cicle cel·lular ... 9
- p27, regulació de l'expressió i degradació ... 11
- p27, dualitat en el càncer: supressor tumoral i oncogen ... 13
- p27, regulació de la transcripció ... 15

3. L'acetilació i les acetiltransferases (HAT) ... 17
3.1. p300/CBP Associated Factor (PCAF) ... 19
- PCAF i transcripció ... 21
- PCAF, cicle cel·lular i diferenciació ... 24
- PCAF i càncer ... 24

HIPÒTESI I OBJECTIUS 27

MATERIALS I MÈTODES 31

1. Tècniques de Biologia Molecular ... 33
1.1. Plasmidis utilitzats ... 33
1.2. Subclonatges ... 34
1.3. Transformació bacteriana ... 35
1.4. Aïllament de DNA genòmic ... 36
1.5. Clonatge de les seqüències d'unió a cromatina de p27 i PCAF ... 36

2. Cultius cel·lulars ... 37
2.1. Manteniment de cèl·lules en cultiu ... 37
2.2. Aïllament de fibroblasts embrionaris de ratolí ... 38
2.3. Sincronització de cèl·lules en quiescència ... 38
2.4. Inhibició de la síntesi i la degradació de proteïnes ... 39
2.5. Transfecció de cèl·lules ... 39
2.6. Obtenció de cultius cel·lulars *knockdown* de p27 o PCAF ... 40
- Producció i infecció lentiviral: ... 40
2.7. Obtenció de lisats cel·lulars i quantificació de proteïna total ... 40

3. Electroforesi, electrotransferència i immunodetecció de proteïnes ... 42
3.1. Electroforesi de proteïnes (SDS-PAGE) ... 42
3.2. Electrotransferència ... 43
3.3. Immunodetecció (*Western Blot)* ... 43

4. Localització de proteïnes 45
4.1. Immunocitoquímica per a microscòpia de fluorescència 45
4.2. Immunocitoquímica per a la detecció amb peroxidasa 45
4.1.1. Comptatge de cèl·lules amb tinció nuclear o citoplasmàtica de p27.....46

5. Detecció d'interaccions proteïna-proteïna/proteïna-DNA 47
5.1. Immunoprecipitació de proteïnes (IP) 47
5.2. Immunoprecipitació de cromatina (ChIP) i RT-PCR.....47

6. Anàlisi d'expressió 50
6.1. Extracció RNA 50
6.2. Retrotranscripció.....50
6.3. RT-PCR 50
6.4. Assaig luciferasa 52

7. Tècniques High-throughput 53
7.1. Microarray d'expressió.....53
7.2. Seqüenciació de la Immunoprecipitació de cromatina (ChIP-seq) 53
- Motius *De novo* 56
- Anàlisi d'agrupació funcional 56
- Anàlisi dels Factors de Transcripció 57
- Co-ocurrència i enriquiment dels Factors de Transcripció al voltant dels pics enriquits 57
- Anàlisi de solapament de pics 57

RESULTATS 59

p27 i PCAF, estabilitat i interacció 61

1. PCAF regula l'estabilitat de la proteïna p27 mitjançant la seva acetilació en la lisina 100..... 61
- p27 i PCAF co-localitzen al nucli 61
- p27 és acetilada en la K100 *in vivo*.....62
- L'acetilació en la K100 regula l'estabilitat de p27 63

2. PCAF interacciona amb p27 acetilada durant la fase G1 del cicle cel·lular 65
- L'acetilació de p27 durant el cicle cel·lular 65
- PCAF i p27 interaccionen durant el cicle cel·lular en diversos models cel·lulars ...66

3. Caracterització de PCAF en cèl·lules MEFs KO de p27 68
- PCAF es troba disminuïda en cèl·lules MEFs KO de p27.....68

p27 i PCAF col·laboren en la regulació transcripcional.....71

1. ChIP-seq de p27 i de PCAF 71

- Distribució dels pics significatius 72
- Anàlisi d'agrupació funcional 77
- Motius d'unió al DNA de p27 i PCAF 82
- Enriquiment de motius d'unió a Factors de Transcripció d'unió en els pics d'interacció de p27 i PCAF amb la cromatina 83
- Pics d'interacció comuns de p27 i PCAF amb la cromatina 85

2. Microarrays & ChIP-seqs 89

- Microarray d'expressió en cèl·lules HCT116 *knockdown* de PCAF 89
- Microarray i ChIP-seq 91

3. Estudi funcional del paper de PCAF i p27 en la transcripció dels gens escollits 92

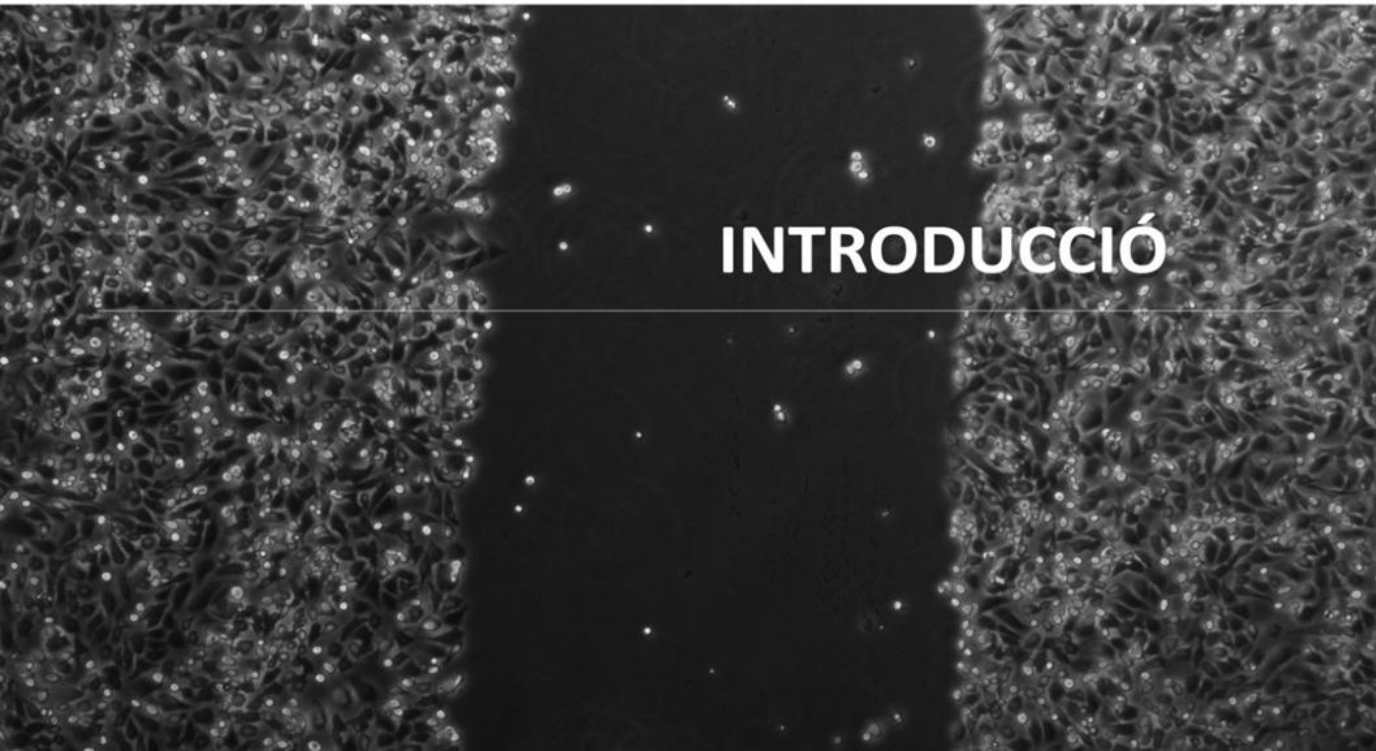
- Expressió gènica en cèl·lules HCT116 *knockdown* de p27 o PCAF 92
- Expressió gènica en cèl·lules HCT116 que sobrexpressen p27 o PCAF 97
- Expressió gènica en cèl·lules HCT116 doble kd de p27 i PCAF 100
- Anàlisi funcional de les seqüències d'unió a cromatina de p27 i PCAF 101
- Estudi dels motius d'unió a Factors de Transcripció dels pics d'interacció amb la cromatina de p27 i PCAF 103

DISCUSSIÓ 107

CONCLUSIONS 121

BIBLIOGRAFIA 127

PUBLICACIÓ 143



INTRODUCCIÓ

Els organismes vius estan formats per cèl·lules, des del més simple al més complex.

Els organismes eucariotes, i nosaltres en particular, provenim d'una sola cèl·lula. Al fecundar-se l'ovòcit amb les cèl·lules de l'esperma es produeix el zigot, una cèl·lula amb les instruccions necessàries per a construir el cos humà, format per aproximadament unes 100 bilions de cèl·lules. Així doncs, aquesta cèl·lula inicial proliferarà i es diferenciarà en teixits, que al seu torn s'organitzaran per a formar òrgans.

La capacitat de divisió de les cèl·lules és fonamental per a tots els organismes vius. Aquest procés l'anomenem cicle de divisió cel·lular.

1. El cicle cel·lular

El cicle cel·lular és una seqüència d'accions que duu a terme la cèl·lula i que té com a objectiu la duplicació de tot el material cel·lular, originant dues cèl·lules filles genèticament iguals a la mare. En les cèl·lules eucariotes aquest procés es divideix en 2 fases: la interfase i la mitosi (M). Al seu torn, la interfase engloba les fases G1, S i G2 (**Figura 1**) (Alberts et al. 2002; Lodish et al. 2000).

En cèl·lules humanes en cultiu el cicle cel·lular s'assoleix típicament en 24 hores: la mitosi duraria 1 hora mentre que la interfase comprendria les 23 hores restants.

En la fase S (*Synthesis*) es dóna la replicació del DNA, així com la síntesi de les histones, donant dues cromàtides germanes. En la fase M es dóna la segregació cromosòmica i la divisió cel·lular.

Precedint les fases S i M trobem respectivament les fases G1 (*Gap1*) i G2 (*Gap2*) on es dóna el creixement cel·lular necessari per tal d'assolir la mida adient. No obstant, s'ha demostrat que durant aquestes fases a banda del creixement, la cèl·lula ha desenvolupat mecanismes per tal de monitoritzar l'avenç del cicle cel·lular. Si les condicions ambientals ho permeten i la preparació de la cèl·lula és òptima es permetrà passar a la següent fase.

La fase G1 és especialment important en aquest aspecte. Pot variar dràsticament la seva durada segons les condicions externes i les senyals extracel·lulars que rep d'altres cèl·lules durant aquesta fase. Si les condicions externes són desfavorables, la cèl·lula retardarà l'entrada a G1 i passarà a un estat de quiescència (fase G0), on no es donarà la divisió cel·lular (Vermeulen et al. 2003). Hi ha molts teixits que es troben en aquest estat de quiescència de forma permanent fins a la mort de

l'organisme. Per contra, en cèl·lules en divisió, quan les condicions externes (presència de mitògens) tornen a ser favorables, la cèl·lula entrarà en un nou cicle cel·lular.

No obstant, tot i que els senyals externs siguin desfavorables, si la cèl·lula ja ha iniciat la fase G1 fins a un cert punt, anomenat punt de restricció (R), ja no podrà aturar-se (Pardee 1974; Planas-Silva & Weinberg 1997). També existeixen punts de control de la progressió del cicle cel·lular (Hartwell & Weinert 1989). La disrupció d'aquests mecanismes de control és un punt crític en el desenvolupament del càncer, ja que les mutacions en proteïnes reguladores de la fase G1 permeten que les cèl·lules proliferin sense que es donin les condicions òptimes (Malumbres & Barbacid 2001).

1.1. Regulació del cicle cel·lular

El cicle cel·lular és molt complex i requereix una regulació molt fina. Aquesta regulació és duta a terme essencialment per tres famílies de proteïnes: les quinases dependents de ciclines (CDKs), les seves subunitats reguladores anomenades ciclines i les CKIs (*CDK-Inhibitory proteins*) (Morgan, D.O. 2007) (**Figura 1**).

Les **CDKs** són serin/threonin quinases que presenten uns expressió més o menys constant al llarg del cicle cel·lular, i van actuant de forma seqüencial gràcies a l'aparició cíclica de les seves subunitats reguladores, les ciclines. Al formar-se aquests heterodímers ciclina/CDK el complex és torna actiu i les CDKs poden fosforilar els seus substrats (Malumbres & Barbacid 2005).

La família de les CDKs compren 20 membres que s'anomenen CDK1 fins CDK20. Des del punt de vista funcional participen en dos processos cel·lulars importants: el cicle de divisió cel·lular i la transcripció. Les més conegudes implicades en el cicle cel·lular són: CDK1, CDK2, CDK4 i CDK6.

Les **ciclines** són les subunitats reguladores de les CDKs i la seva expressió és un procés molt regulat i ordenat ja que és sintetitzen just en el moment del cicle cel·lular en que són necessàries per activar les CDKs.

Formen una extensa família de 29 membres, però no tots estan implicats en la regulació de les CDKs. En la **Taula 1** podem veure les parelles ciclina-CDKs més destacades en cada fase del cicle cel·lular.

Les ciclines D1, D2 i D3 són les primeres que es sintetitzaran en resposta a les senyals mitogèniques, regulant les CDKs de la fase G1 (CDK4 i 6). Aquestes darreres s'activen i fosforilen els seus substrats, les proteïnes de la **família del Retinoblastoma** (pRB), que inclou el pRB, la p107 i la p130 (Kato, Matsushime, Hiebert, Ewen, & Sherr, 1993). Les proteïnes pRB regulen la transcripció de gens necessaris per a la progressió de G1, mitjançant la unió i modulació de factors de transcripció de la **família E2F**, histones deacetilases i remodeladors de la cromatina (Cobrinik 2005) (**Figura 1**). Uns dels gens diana crucials regulats pel complex pRb-E2F són les ciclines tipus-E, necessàries per a l'activació de les CDK2 i la finalització de la fase G1. Aquesta parella ciclina-CDK seguirà fosforilant proteïnes del complex pRb-E2F, aconseguint que pRb assoleixi un estat d'hiperfosforilació que permetrà la transcripció dels gens involucrats en la fase S (Koff et al. 1992). Dins els quals trobem la ciclina A, que predominarà durant la fase S unida a CDK2. En la transició G2/M s'associarà a CDK1 per a promoure l'entrada a M. La ciclina B, junt a CDK1 serà la responsable de regular la mitosi (King et al. 1994).

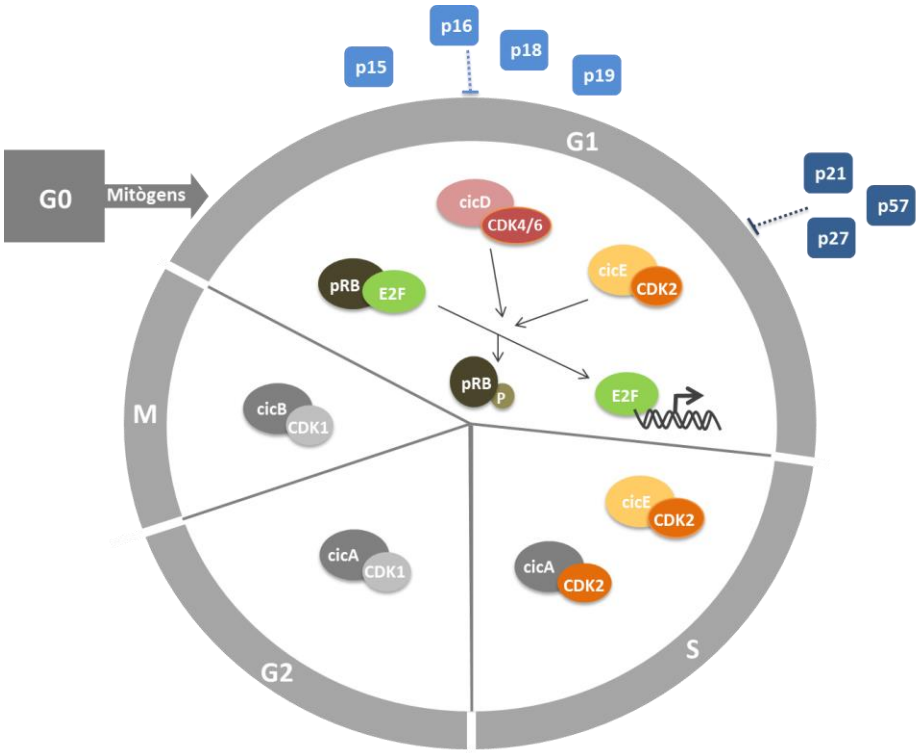


Figura 1. **Esquema de les principals fases del cicle cel·lular en els mamífers.** La progressió al llarg del cicle cel·lular depèn de la formació de complexes específics ciclina-CDKs. La fosforilació del retinoblastoma (pRB) pels complexes ciclinaD-CDK4/6 i ciclinaE-CDK2 és clau per a l'entrada en la fase S, aquesta fosforilació es mantindrà posteriorment pels complexes ciclina A/B-CDKs. Les CDKs són regulades per els CKI de la família INK (p15, p16, p18 i p19) o la família Cip/Kip (p21, p27 i p57).

Normalment, la unió de les ciclines a les CDKs no és suficient per a l'activació completa de les CDKs. Necessiten ser fosforilades, en un residu treonina molt conservat en la majoria dels membres de la família, la T160 a CDK2 (o els equivalents a les altres CDKs). Aquesta fosforilació és duta a terme pel complex CAK (ciclina H-CDK7 i Mat1), fet que permetrà l'activació completa de les CDKs (Lew & Kornbluth 1996).

En canvi, les fosforilacions dutes a terme per les quinases Wee1 i Myt1 als residus T14 i Y15, inhibiran les CDKs. Les fosfatases Cdc25 són les encarregades d'alliberar les CDKs d'aquesta inhibició al defosforilar aquests residus, provocant l'entrada en la mitosis (Malumbres & Barbacid 2001).

2. Proteïnes inhibidores de CDKs (CKIs)

L'activitat dels complexes ciclina-CDK també està modulada per la unió de proteïnes inhibidores, les CKIs. Basant-se en la homologia de seqüències d'aquestes proteïnes i en la seva funció específica, es poden agrupar en 2 famílies: la INK4 (inhibidors de CDK4) formada per $p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$, $p18^{INK4C}$ i $p19^{INK4D}$, i la Cip/Kip (*CDK interacting protein/Kinase inhibitor protein*) a la que pertany $p27^{KIP1}$ i consta de dos membres més: $p21^{CIP1}$ i $p57^{KIP2}$ (**Figura 1**).

La propietat general que defineix les CKIs és la seva capacitat d'inhibició de les CDKs (Sherr & Roberts 1999).

Les proteïnes de la **família INK4** s'uneixen de forma monomèrica a les CDK4/6 per la seva regió no catalítica impedint-ne la unió amb la ciclina D. Els gens de la família INK4 presenten una patró d'expressió divers, fet que suggereix una especificitat de les seves funcions segons el seu llinatge cel·lular o tissular (Roussel 1999). En els últims anys s'ha descrit la seva implicació en altres processos com la senescència, l'apoptosi i la reparació del DNA, a banda de la seva funció principal com a reguladors del cicle cel·lular (Kim & Sharpless 2006; Cánepa et al. 2007).

Les proteïnes de la **família Cip/Kip** formen un complex trimèric al interaccionar amb les dues subunitats dels complexes ciclina-CDK. Inicialment, s'havia descrit el paper regulador de les proteïnes Cip/Kip sobre els complexes que forma CDK2. Posteriorment però, s'ha demostrat que p27 i p21 també són necessàries per a la regulació de l'activitat dels complexes que formen la CDK4/6 amb la ciclina D (LaBaer et al. 1997; Larrea et al. 2008; Ray et al. 2009). I més recentment s'han descrit altres funcions relacionades amb diversos processos cel·lulars com són:

resposta al dany al DNA i a diferents tipus d'estrès, diferenciació cel·lular, procés apoptòtic, regulació del citoesquelet i regulació de la transcripció.

En aquesta Tesi ens centrarem en la CKI $p27^{KIP1}$ (p27).

Taula1. Resum dels complexes ciclina-CDK i dels seus corresponents inhibidors en cada fase del cicle cel·lular.

	Ciclines	CDKs	CKIs
G1	Ciclina D Ciclina E	CDK4/6 CDK2	p16,p15, p18, p19 / p21, p27, p57 p21, p27, p57
S	Ciclina A Ciclina E	CDK2 CDK2	p21, p27 p21, p27
G2	Ciclina A	CDK1	p21, p27
M	Ciclina B	CDK1	p21, p27

2.1. p27

p27 és una proteïna de 27 kDa que està codificada pel gen anomenat CDKN1B, situat en el cromosoma 12, i va ser clonada per diversos grups a l'any 1994 (K Polyak et al. 1994; Toyoshima & Hunter 1994).

p27 és una proteïna ubiqua, la trobem expressada en major o menor concentració en tots els teixits. En G0 p27 presenta una concentració elevada i davant de les senyals mitogèniques s'anirà degradant al llarg de G1 (Eblen et al. 1995; Bresnahan et al. 1996). A diferència d'altres CIKs, p27 es troba expressada constitutivament durant tot el cicle cel·lular. Fet contradictori amb la funció tradicional de les CIKs com a inhibidors de CDKs i que ens indica una major complexitat en les seves funcions reguladores (Blain 2008).

S'ha vist que p27 en condicions fisiològiques presenta uns estructura anomenada intrínsecament desordenada (IUPs, *Instrinsically Unstructured Proteins*). Aquesta característica es troba en proteïnes involucrades en importants processos cel·lulars, ja que permet la formació d'unions d'alta afinitat amb lligands diversos. Mitjançant tècniques de cristal·lografia es va definir la interacció de p27 amb ciclinaA-CDK2. En aquestes condicions l'estructura de p27 s'ordena facilitant-ne la unió (Russo et al. 1996; Flaugh & Lumb 2001; Sivakolundu et al. 2005).

En la regió N-terminal presenta un **domini KID** (*Kinase Inhibitory Domain*) que interacciona amb les CDKs i les ciclines (aa25-90) (**Figura 2**). No té una estructura

definida en solució però es plega seqüencialment a mida que va interaccionant amb la CDK i la ciclina. Aquest domini és comú a la resta de membres de la família (p21 i p57).

Entre els aa (aminoàcids) 32 i 45 hi trobem la **seqüència NES** (*Nuclear Export Signal*) per on interaccionarà amb JAB1 i CRM1 per ser exportada al citoplasma durant la G1 (Connor et al. 2003).

En la zona central de p27, entre els aminoàcids 90 i 96 trobem una regió rica en prolines **PRD**, (*Proline Rich Domain*), és tracta d'una regió típica d'interacció amb proteïnes que contenen el domini SH3 (*Src homology 3*) (S 2005). La proteïna Grb2 s'uneix pel PRD a p27. Aquesta proteïna és un activador de la via de Ras que afavorirà el progrés de la fase G1 (Sugiyama et al. 2001; Moeller et al. 2003). Adjacent al PRD de p27 hi ha una regió d'unió a la proteïna del por nuclear mNPAP60.

En la regió C-terminal s'han descrits interaccions amb proteïnes no implicades en la regulació del cicle cel·lular com la RhoA, Rac, Estatmina i 14-3-3 (Borriello et al. 2007). Aquestes interaccions l'han relacionat amb la motilitat cel·lular i la regulació del citosquelet. També hi trobem la **seqüència NLS** (*Nuclear Locatization Signal*) bipartida (aa152-153/166-168), per on interaccionen les importines α i β encarregades del seu transport cap el nucli.

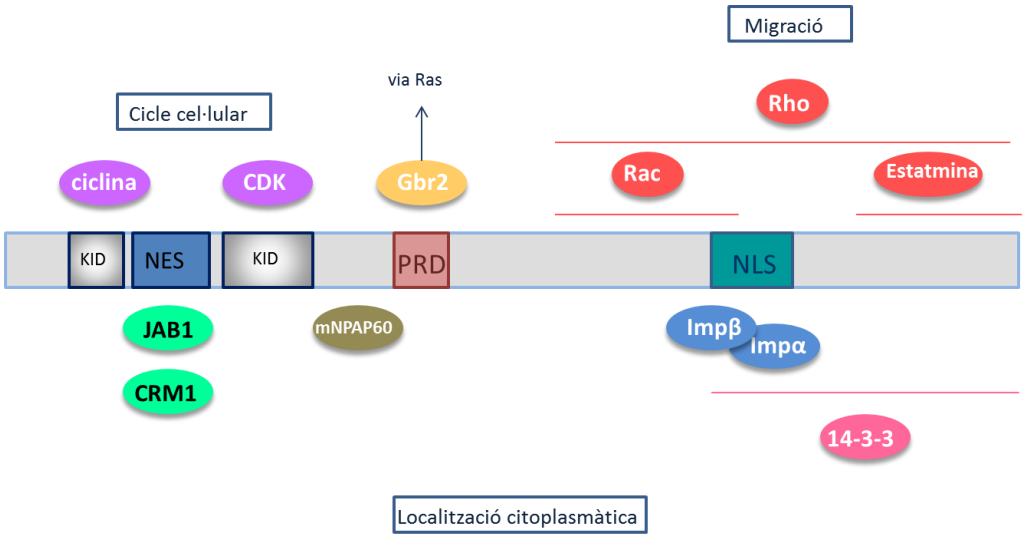


Figura 2. Esquema dels principals dominis estructurals de p27, les principals proteïnes que hi interaccionen i els processos cel·lulars en els quals estan implicats.

- **p27, dualitat en la regulació del cicle cel·lular**

Quan la cèl·lula en G0 rep senyals mitogèniques sintetitza la ciclina D promovent la formació dels complexes ciclina D-CDK4 entrant a la fase G1. Però l'afinitat entre aquestes proteïnes és dèbil, necessita la unió de p27 que actuarà com a xaperona. Per tal que p27 pugui actuar ha de ser fosforilada en T157 per AKT i en T198 per AKT i RSK. Aquestes fosforilacions de p27 en G1 permetran un complex trimèric amb la ciclina D-CDK4 que romandrà inactiu degut a la unió amb p27 i també al fet que no podrà ser fosforilat activament per la CAK. Aquestes dues fosforilacions T157 i T198 regulen la degradació proteasomal de p27 en G1 (**Figura 3 i 4**).

Per tal que la CDK unida a aquest complex trimèric s'activi, caldrà que p27 sigui fosforilada per tirosina quinases de la família SRC en els residus Y74, Y88, Y89 (que es troben dins el domini KID) (**Figura 3**). Aquestes quinases s'activen per estímuls mitogènics. Primer de tot, es fosforila la Y88 que provoca un canvi conformacional exposant la Y74, que serà al seu torn, fosforilada. En aquest estat p27 permet l'activació parcial del complex ciclina D-CDK4 i a més facilita la fosforilació de CDK4 per la CAK (Larrea et al. 2008; Ray et al. 2009; Ou et al. 2012).

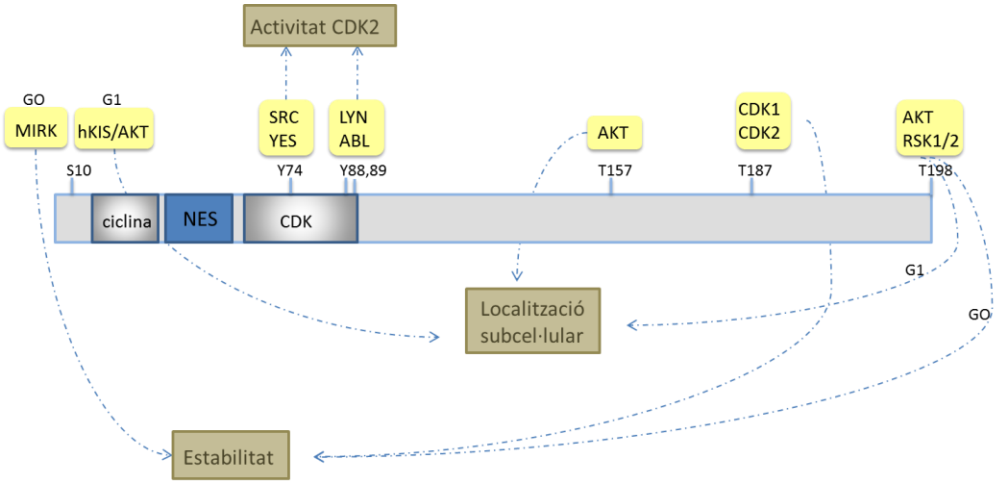


Figura 3. Model de les modificacions post-traduccionals de p27. Fosforilacions produïdes per les famílies de quinases en groc. En marró s'observen els processos cel·lulars en que estan implicades aquestes modificacions.

Aquí veiem doncs, la dualitat del paper de p27 en el cicle cel·lular, en G0 actua d'inhibidor, mentre que en G1 modula la formació, l'estabilització i l'activació gradual del complex ciclinaD-CDK4. Aquest descobriment ha portat a reconsiderar el concepte de p27 com a inhibidor i a ampliar-lo com a 'reclutador' de ciclines-CDKs (Blain 2008) (**Figura 4**).

De la mateixa manera, en la transició G1/S, p27 s'associa a ciclina E-CDK2, formant un trímer inactiu, que s'activarà parcialment a mesura p27 sigui fosforilada en els residus tirosina. Aquesta activació parcial de la CDK2 permetrà que aquesta fosfori-li p27 en la T187, senyal que la portarà a degradar i alliberarà totalment el complex ara ja si, totalment actiu que iniciarà la fase S (Grimmler et al. 2007; Chu et al. 2007).

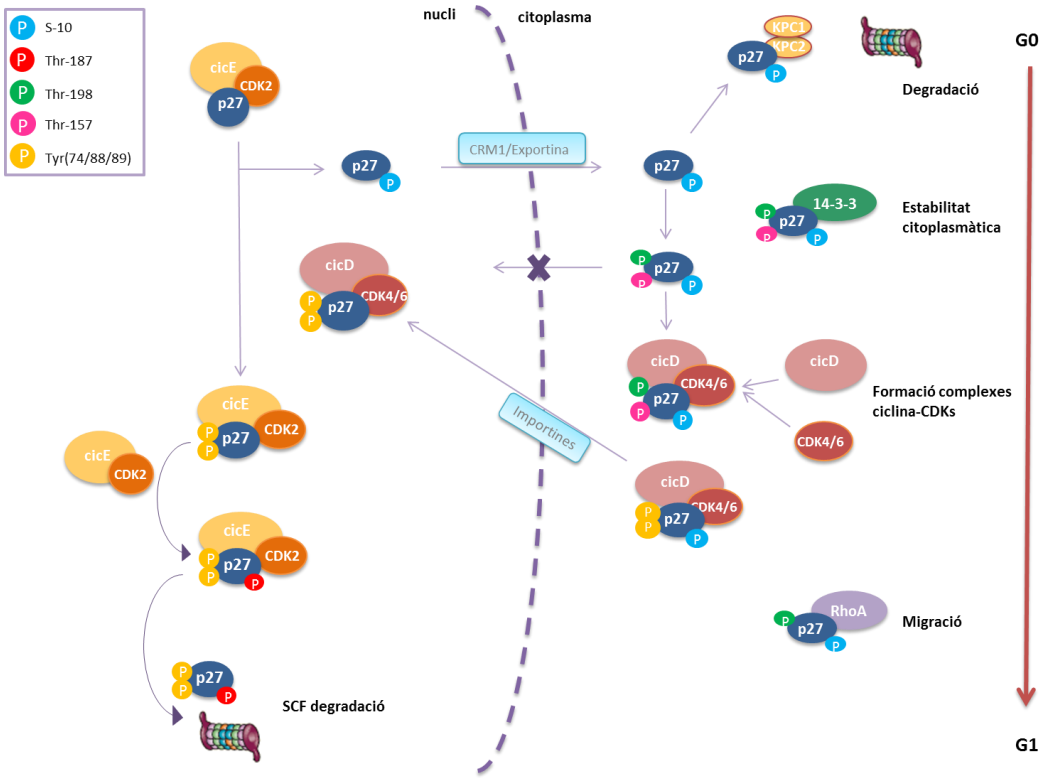


Figura 4. Model de l'estabilitat i degradació de p27. L'estabilitat i la funció de p27 ve regulada per la seva localització subcel·lular, la interacció amb proteïnes i el seu estat de fosforilació. p27 interacciona amb ciclines-CDKs en el nucli impedint la progressió del cicle cel·lular. Quan s'exporta al citoplasma p27 pot interaccionar amb ciclina D i CDKs ajudant a la formació dels complexes. La fosforilació de p27 en diferents llocs promourà la seva interacció amb diversos complexes proteics fet que provocarà o bé la seva estabilitat o bé la seva degradació.

- **p27, regulació de l'expressió i degradació**

A **nivell transcripcional**, l'expressió del mRNA de p27 es manté considerablement estable al llarg del cicle. Aquest fenomen implica que existeixin uns importants mecanismes a nivell post-traduccional que en regulin la seva degradació proteica . Tot i això, s'han descrit factors de transcripció que en regulen la seva expressió. Els més estudiats són els de la família FOXO, activats per PI3K (Dijkers et al. 2000; Medema et al. 2000). A banda, durant el cicle cel·lular, els complexes ciclina E-CDK2 inactiven, mitjançant fosforilació, a pRb, permetent així la transcripció de p27, mediada per E2Fs. Aquesta p27, al seu torn, inhibirà l'activació dels complexes ciclina E-CDK2 impedint l'activació de més factors E2F (Wang et al. 2005).

A **nivell traduccional** sabem que la síntesi de la proteïna p27 és màxima en cèl·lules quiescents i disminueix dràsticament quan les cèl·lules comencen a proliferar (Hengst & Reed 1996). Aquesta regulació depèn del grau d'associació del mRNA de p27 als poliribosomes (Millard et al. 1997). Estudis recents han descrit diversos miRNAs capaços de regular els nivells del mRNA de p27 inhibint-ne la seva traducció (Galardi et al. 2007; Cuesta et al. 2009).

A **nivell post-traduccional** trobem que els nivells proteics de p27 depenen principalment de la seva degradació per proteòlisi en el citoplasma, procés que es troba íntimament lligat amb el control de la localització subcel·lular de p27 (**Figura 5**).

La localització subcel·lular ve marcada bàsicament per les fosforilacions als residus S10, T157, T187 i T198 (**Figura 3 i 4**).

En quiescència, la localització de p27 és nuclear i per a mantenir-la estable les quinases MIRK/DYRK1B, la fosforilen en la S10 (Besson et al. 2006; Kotake et al. 2005) (**Figura 3**). La S10 no és la única modificació en quiescència que confereix estabilitat a p27, també trobem la fosforilació en la T198.

Al entrar en la fase G1 aquestes fosforilacions (S10 i T198) es mantenen, aquest cop provocades per les quinases depenent d'estímuls mitogènics, hKIS, AKT i ERK2, i que en promouran el seu transport citoplasmàtic a través de la JAB1-CRM1 (Kotoshiba et al. 2005; Ishida et al. 2002), encara que en altres models s'ha vist que la fosforilació en S10 és prescindible (Kotake et al. 2005) (**Figura 3**). Un cop en el citoplasma, la ubiqüitina lligasa KPC1/2 (*Kip ubiquitylation-promoting complex*) provoca la poli-ubiqüitinització de la p27 que promourà la seva degradació proteasomal al inici de G1 (Kamura et al. 2004; Kotoshiba et al. 2005) (**Figura 5**).

Així doncs, la S10 en G1 (en el citoplasma) promou la seva degradació contràriament al seu efecte en G0 en que té un paper estabilitzador (**Figura 3 i 4**).

Al inici del G1 la S10 també estimula l'associació de p27 amb els complexes ciclina D-CDK4, en canvi la p27 amb T198 fosforilada té preferència pels complexes ciclina E-CDK2 (Vervoorts & Lüscher 2008).

En G1 també es dóna la fosforilació per AKT en T157, localitzada dins la seqüència NLS de p27 i que junt amb la T198 promou la localització citoplasmàtica de p27. Aquestes dues fosforilacions faciliten la interacció amb les proteïnes 14-3-3 que competeixen amb les importines, impedint la importació de p27 cap al nucli (Fujita et al. 2002).

En la transició G1/S, quan s'activen els complexes ciclina E-CDK2 al final de la G1, els nivells proteics de p27 disminueixen dràsticament degut a una disminució en la estabilitat de p27. Aquest fenomen depèn de la fosforilació en T187 donat pels complexes ciclina E/A-CDK2. Aquesta modificació permetrà la unió amb SKP2, un component del complex SCF ubiqüitina lligasa (*Skp1/Cul1/F-box protein*) que en promourà, junt amb CKS1, la seva poli-ubiqüitinització i posterior degradació proteasomal durant les fases S i G2 (Vervoorts & Lüscher 2008) (**Figura 3, 4 i 5**).

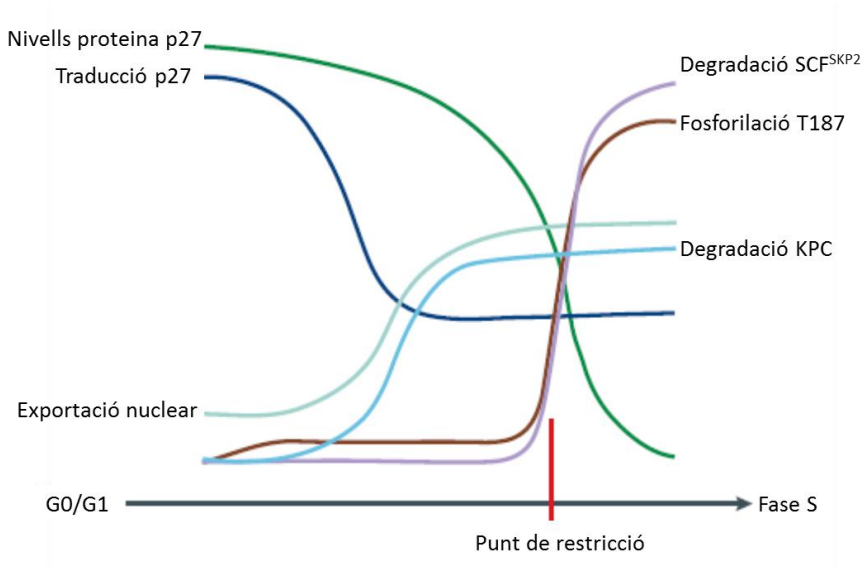


Figura 5. Model de la regulació de p27 durant les fases G0/G1 a S. Durant la fase G1 la traducció de p27 disminueix. Al inici de G1 tant l'exportació nuclear com la degradació duta a terme pel complex ubiqüitinitzador KPC s'incrementa. Al final de la fase G1 augmenta la fosforilació de p27 en la T187, que la senyalitza per a ser degradada pel complex SCF^{SKP2}. (Chu IM, Hengst L, Slingerland JM. Nat Rev Cancer. 2008, Apr;8(4):253-67).

Les modificacions post-traduccionals més estudiades tant de p27 com d'altres proteïnes implicades en el cicle cel·lular són, com ja hem pogut observar, les fosforilacions en serines, treonines i tirosina. Darrerament en el nostre laboratori s'han estudiat les modificacions per acetilació observades en diferents proteïnes reguladores del cicle cel·lular com la CDK2 i la ciclina A (Mateo et al. 2009), i més recentment, de p27 (Pérez-Luna et al. 2012), per tal de definir-ne la seva funció.

- **p27, dualitat en el càncer: supressor tumoral i oncogen**

Inicialment, p27 va ser considerada un supressor de tumors degut a la seva funció d'inhibidor dels complexes ciclina-CDK (Kornelia Polyak et al. 1994; Toyoshima & Hunter 1994).

Aquesta idea era corroborada també pel fet que en un nombre significatiu de tumors humans els nivells de p27 es trobaven disminuïts i això es correlacionava amb un mal pronòstic de la malaltia (**Figura 6**) (Chu et al. 2008). Curiosament, i a diferència d'altres CIKs, els membres de la família Cip/Kip gairebé mai apareixen mutats en tumors. En el cas de p27, només s'han trobat alguns casos de delecions o inactivacions en mostres puntuals i més darrerament s'han trobat alguns casos de mutacions germinals en neoplàsies endocrines múltiples (MEN) (Marinoni & Pellegata 2011; Vandeva et al. 2010). A banda d'aquests casos concrets, en la majoria dels tumors el que trobem desregulat és la quantitat o la localització de p27 (Catzavelos et al. 1997; Esposito et al. 1997; Loda et al. 1997; Porter et al. 1997; Singh et al. 1998).

Els ratolins p27KO presenten una hiperplàsia generalitzada i són més susceptibles a l'aparició de neoplàsies espontànies i induïdes en diferents òrgans, sobretot en la glàndula pituïtària (Nakayama et al. 1996). Tanmateix, el fenotip dels ratolins p27KO és lleu en comparació amb el dels ratolins haplosuficients (p27+/-), que desenvolupen tumors en tots els òrgans, i l'al·lel funcional de p27 es manté en les cèl·lules tumorals (Fero et al. 1996). Aquest fet va canviar la perspectiva de que p27 ja no pot ser considerat com a un supressor de tumors clàssic, sinó haplosuficient.

Englobant aquests resultats amb el fet que en tumors humans no es doni la deleció completa ni mutacions de p27, va fer sospitar que un mínim d'activitat de p27 era necessària per al progrés de les cèl·lules tumorals degut a la seva descoberta activitat com a xaperona de ciclina D-CDK4 (Larrea et al. 2008; LaBaer et al. 1997).

A més, cal afegir que en alguns tumors la localització citoplasmàtica de p27 és predominant. En el citoplasma, p27 no pot inhibir les ciclines-CDKs, però s'ha vist que és capaç de regular els filaments d'actina a través de la inhibició de Rho A, a la qual s'uneix per la seva zona C-terminal (Besson et al. 2004) (**Figura 2**). Un augment de p27 citoplasmàtica implica un augment en la motilitat de la cèl·lula, que si és tumoral li confereix propietats més invasives (Wu et al. 2006; Larrea et al. 2009).

Posteriorment, es va veure que la interacció de p27 amb la Estatmina (proteïna implicada en la desestabilització dels microtúbuls), inhibeix la seva activitat, provocant un augment en l'estabilitat dels microtúbuls que té com a resultat una disminució en la motilitat (Baldassarre et al. 2005). Així doncs, la disminució de p27 en els tumors provoca una major inestabilitat del microtúbuls i per tant un increment de la motilitat cel·lular. Això, s'afegeix a les propietats invasives que trobem en les cèl·lules tumorals amb poca p27.

Paral·lelament, s'ha descrit el paper de p27 en la promoció de la diferenciació en teixits com el múscul (Vernon & Philpott 2003), teixit neuronal (Vernon et al. 2006; Nguyen et al. 2006), queratinòcits (Hauser et al. 1997), cèl·lules epitelials (Quaroni et al. 2000) o cèl·lules hematopoètiques (Acosta et al. 2008). I s'ha vist que aquesta funció és independent a ciclines-CDKs. En general, els tumors requereixen algun grau de desdiferenciació, propietat que es troba relacionada amb l'agressivitat del tumor. Així doncs, la diferenciació confereix protecció envers la transformació tumoral de les cèl·lules (Hanahan & Weinberg 2011).

Per aclarir si p27 promovia la formació de tumors i si aquesta propietat era dependent o independent de la seva principal funció en el cicle cel·lular, com a inhibidor dels complexes ciclina-CDK, es van generar ratolins p27CK-. En aquests ratolins se'ls hi ha substituït la p27 normal per una p27 portadora de 4 mutacions puntuals que li impedeixen la unió als complexes ciclina-CDKs. Els resultats deien que sorprenentment, els ratolins p27CK- no només generaven tumors, sinó que el nombre i la diversitat fenotípica era molt superior que en els ratolins p27KO (Besson et al. 2007). Per tant, ha quedat constatat que p27CK- presenta funcions oncogèniques independents a la seva capacitat per inhibir els complexes ciclina-CDKs. Pot ser que per aquesta raó en cèl·lules tumorals la p27 no es trobi inactivada sinó que són les vies que en regulen els seus nivells i la seva localització les que trobem modificades (Chu et al. 2008).

La dualitat funcional de p27 en la tumorigènesi requereix un control estricte dels seus nivells per a que guanyi el control del cicle cel·lular sobre les seves funcions

oncogèniques. La desregulació en la majoria dels càncers converteixen a p27 en una bona diana terapèutica i de pronòstic en la malaltia però, s'ha de tenir en compte la seva dualitat en el procés tumorogènic. Les diverses causes que provoquen la disminució de p27 o la modificació en la seva localització, en els diferents tipus de càncers, requereixen un estudi exhaustiu per avaluar en quines situacions seria beneficiosa una teràpia per incrementar els nivells de p27 i en quines no (Nickeleit et al. 2007; Timmerbeul et al. 2006; Chu et al. 2008).

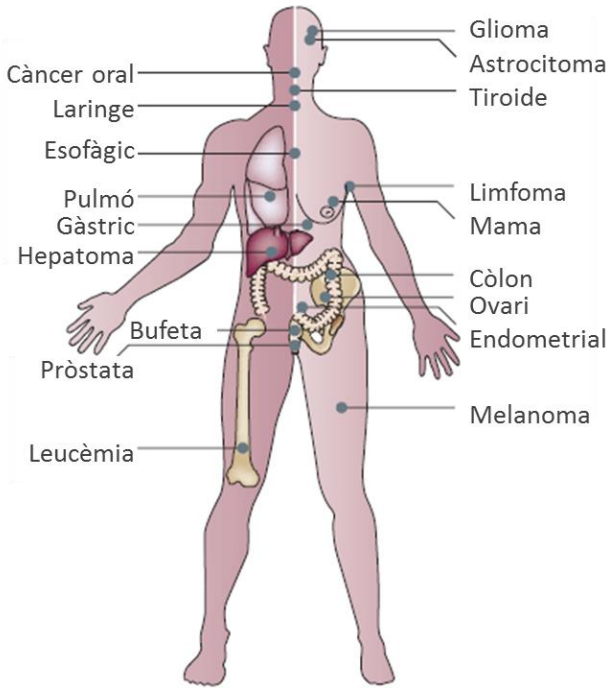


Figura 6. Càncer i expressió de p27. Diversos càncers on els nivells d'expressió de p27 es troben disminuïts (I. M. Chu, Hengst, and Slingerland 2008).

- p27, regulació de la transcripció

Inicialment s'havia demostrat la relació indirecta de p27 amb la regulació de la transcripció. Al inhibir els complexes ciclines-CDKs, les proteïnes pRB (p107, p110 i p130) romanen hipofosforilades mantenint els factors de transcripció E2F segrestats, fet que impedeix la transcripció dels seus gens diana (Besson et al. 2008) (**Figura 1**).

Altres estudis han demostrat que p27 inhibeix l'activitat dels factors de transcripció AP-1, degut a la interacció amb el seu cofactor JAB1. Quan p27 i JAB1 interaccionen són translocades al citoplasma mitjançant l'exportina CRM1. Com a conseqüència d'aquesta translocació AP-1 no podrà interaccionar amb JAB1 en el nucli, quedant inactiu (Tomoda et al. 1999; Claret et al. 1996; Chamovitz & Segal 2001).

També s'ha descrit que la unió de p27 amb els factors de transcripció Myc i Sp1 impedeix la interacció d'aquests factors amb el promotor de hTERT (*human Telomerase Reverse Transcriptase*), inhibint-ne la transcripció en cèl·lules de glioma.

Com anteriorment hem comentant, s'ha vist que p27 promou la diferenciació en diversos teixits, i en ocasions ho fa regulant la transcripció de gens importants en el procés de diferenciació. Aquest és el cas de la seva interacció amb Sp1, p27 estabilitza la unió de Sp1 al promotor del gen MBP (*Myelin Basic Protein*), promovent-ne l'activació (Wei et al. 2003).

Un altre exemple es dóna en el procés de la neurogènesi, en el còrtex cerebral. On s'ha descrit que p27 estabilitza, el factor de transcripció Ngn-2 (*Neurogenin-2*), fet que permet la transcripció de gens específics per a la diferenciació neuronal (Nguyen et al. 2006).

Recentment, en els nostre laboratori, s'ha descrit per primer cop la interacció de p27 amb els promotors de determinats gens, gràcies a la tècnica del ChIP-on-chip. Per una banda, p27 interacciona amb diferents membres de la família de factors de transcripció ETS i reprimeix l'expressió de gens relacionats amb traducció, la transcripció i la respiració. Aquesta funció és independent de l'activitat dels complexes ciclina-CDK. Per altra banda, p27 regula l'expressió de gens involucrats en el cicle cel·lular i en el processament dels pre-mRNAs al interaccionar amb els complexes repressors p130/E2F4 (Pippa et al. 2012).

Aquesta interacció de p27 amb el complex repressor p130/E2F4/Sin3A també s'ha vist implicat en la repressió transcripcional del gen Sox2, un factor de transcripció involucrat en el manteniment de la pluripotència de cèl·lules mare neurals, que es veu reprimit en la diferenciació al interaccionar amb aquest complex repressor (Li et al. 2012).

Aquesta innovadora funció de p27 com a regulador de la transcripció ens ha dut a voler profunditzar en el paper que p27 juga en la transcripció.

3. L'acetilació i les acetiltransferases (HAT)

L'acetilació consisteix en una reacció química per la qual s'introdueix un grup acetil a un o més aminoàcids, substituint-ne un àtom actiu d' hidrogen.

Es poden acetilar els grups α-amino dels residus localitzats en els extrems d'una proteïna o pèptid, aquest fenomen es dóna durant el procés de traducció i és dut a terme per les NAT (*N-terminal acetyltransferases*), que transfereixen el grup acetil d'un Ac-CoA (Acetil-CoenzimA). Aquesta acetilació treu la càrrega positiva del grup amino N-terminal, canviant així les propietats químiques del extrem N de la proteïna. Es tracta d'una modificació irreversible. En eucariotes és una de les modificacions co-traduccionals més comuns, el 85% de les proteïnes humanes presenten aquesta modificació covalent, i tenen un paper important en la síntesi, estabilitat i localització de les proteïnes (Starheim et al. 2012).

Les proteïnes també es poden acetilar en els grups ε-amino de les seves lisines, es tracta d'una modificació post-traduccional i reversible, aquesta acetilació dependrà de l'equilibri entre les HAT (*histone acetyltransferases*) i les HDAC (*histone deacetyltransferases*), els enzims encarregats de transferir o extreure un grup acetil a partir del Ac-CoA (Sadoul et al. 2008). S'anomenen així degut a que en el 1960 es va descobrir per primer cop aquesta modificació en les cues de les histones, i es va correlacionar amb un estat transcripcionalment actiu de la cromatina. A partir d'aquí s'han anat descobrint proteïnes no-histones que també són susceptibles de ser acetilades, com per exemple la p53, la α-tubulina i la MCM3, proteïnes molt diverses involucrades en diferents processos cel·lulars, però en la seva majoria es tracten de factors de transcripció (**Taula 2**) (Choudhary et al. 2009; Glozak et al. 2005).

S'ha trobat aquesta modificació post-transcripcional, l'acetilació, en eubacteris i arquees, per tant és un mecanisme de regulació altament conservat en l'evolució (Bell et al. 2002).

Les lisines, a banda de ser acetilades, també poden ser metilades, ubiqüitinitzades i sumoilades. Aquestes modificacions són excloents i tenen repercussions funcionals diferents. Per exemple, quan la cromatina està acetilada és transcripcionalment activa, mentre que si es troba metilada serà transcripcionalment inactiva. Això és degut a que aquestes modificacions post-traduccionals en les cues amino de les histones en canvien la seva conformació modificant d'aquesta forma l'afinitat amb la que s'uneixen al DNA i a les proteïnes associades a la cromatina (Rice & Allis 2001).

Taula 2. Selecció de proteïnes no histones acetilades. Es mostren les conseqüències funcionals que provoca l'acetilació en aquestes proteïnes.

	Incrementa	Disminueix
Estabilitat Proteïna	p53, p73, c-Myc, Runx3, AR, H2Az, E2F1, Smad7	GATA1, HIF1α, pRb
Unió a DNA	p53, SRY, STAT3, GATA transcription factors, E2F1, NFκB, MyoD, HNF-4	YY1, HMG-A1, NFκB
Expressió gènica	p53, HMG-A1, STAT3, AR, GATA transcription factors, E2F1, NFκB, MyoD, Bcl-6, β-Catenina	HIF1α, STAT1, FOXO1/4
Interacció amb proteïnes	STAT3/1, AR, Importina A, TFIIB, α-Tubulina, actina	RelA, Ku70, Hsp90
Localització	Ac → nucli PCAF, SRY, HNF-4, PCNA	Ac→ citosol c-Abl, p300, PAP
Estabilitat mRNA	p21, Brm	Th, eNOS
Activitat enzimàtica	p300, ATM	PTEN, HDAC1, Mdm2, Polβ
Proteines virals	E1A, HIV Tat	

Des de que es va descobrir cap els anys 60 la primera HAT, HAT1 en *Tetrahymena*, que presenta una seqüència molt similar amb la GCN5, la primera HAT descoberta en llevat, s'han descobert més de 30 proteïnes que posseeixen activitat HAT i que alhora són coactivadors transcripcionals. Presenten una gran varietat en la seva estructura i funcions, però es poden classificar en 2 grans grups: A-HAT i B-HAT. Les HAT de tipus A són nuclears i duen a terme acetilacions relacionades amb la transcripció, es subclassifiquen en 5 superfamílies: GNAT, MYST, CBP/p300, factors de transcripció basals/generals i cofactors de receptors nuclears. Les B-HAT són citoplasmàtiques i acetilen les histones sintetitzades *de novo* que estan lliures pel citoplasma, promovent la seva localització nuclear on s'uniran al nou DNA sintetitzat (Sharon Y. Roth et al. 2003).

Les HAT es troben formant part de complexes macromoleculars (**Taula 3**). Cada una d'aquestes HAT tenen un substrat específic d'histones, així com de proteïnes no-histones, que dependrà també de les subunitats que formin el complex multiproteic (Lee & Workman 2007).

En molts coactivadors amb activitat HAT trobem un domini estructural evolutivament conservat de reconeixement de lisines acetilades, el bromodomini (Dhalluin et al. 1999).

Taula 3. Classes i substrats de les histones acetiltransferases humanes de la família GNAT. Es mostren les subunitats amb les quals interaccionen formant complexes multiproteïcs.

Complexes HAT de la familia GNAT	PCAF	STAGA	TFTC
Subunitat catalítica	PCAF	GCN5L	GCN5L
Histones modificades	H3/H4	H3/H4	H3/H4
Subunitats associades	PAF400	TRRAP	TRRAP
		STAF65γ	
	SPT3	SPT3	SPT3
		STAF42	
	ADA2		
	ADA3	STAF54	ADA3
		SCA7	SCA7
	TAF5L	TAF5L	TAF5L
	TAF6L	TAF6L	TAF6L
	TAF9	TAF9	TAF9
	TAF10	TAF10	TAF10
	TAF12	TAF12	TAF12
			TAF2
		STAF36	TAF4
		STAF46	TAF5
			TAF6

3.1. p300/CBP Associated Factor (PCAF)

El gen de PCAF (*p300/CBP Associated Factor*), anomenat KAT2B (*K (lysine) acetyltransferase 2B*), va ser identificat a partir d'una base de dades de cDNAs humans degut a la seva homologia amb GCN5 (**Figura 7**). Per aquesta raó es va classificar dins la superfamília de **GNAT** (*GCN5-related N-acetyltransferases*). Li deu el seu nom a la seva interacció amb p300 i CBP (Yang et al. 1996). Aquestes dues HAT són proteïnes nuclears i funcionalment homòlogues (per això ens referim a elles com p300/CBP) que regulen la transcripció al interaccionar amb diversos factors de transcripció, al acetilar histones i diferents proteïnes reguladores (Ogryzko et al. 1996).

Al analitzar la capacitat de PCAF en acetilar histones lliures o formant part de nucleosomes, es va veure que principalment acetila la K14 de la histona H3, i secundàriament la K8 en la histona H4. PCAF actuaria de forma conjunta amb p300/CBP sumant-se així a la seva capacitat d'acetilar histones des de diferents angles en el mateix nucleosoma (Ogryzko et al. 1996). PCAF, al igual que les proteïnes p300 i CBP, actua formant part d'un complex multiproteic, de més de 20

polipèptids, capaç d'acetilar histones en un context nucleosomal (Ogryzko et al. 1998) (**Taula 3**).

Com hem comentat abans, la cromatina acetilada s'associa a un estat transcripcionalment actiu ja que presenta una estructura relaxada que en facilita la unió a la RNApol II.

PCAF és una HAT nuclear de 832aa. En la seva **regió amino** (aa121-242) hi trobem la zona d'interacció amb la p300/CBP (**Figura 7**). La proteïna viral E1A i PCAF s'uneixen a la mateixa regió de p300/CBP, fet que produeix una competició entre ambdues proteïnes. Si PCAF s'uneix a p300/CBP la transcripció s'activarà, per contra, si s'uneix a E1A, no podrà actuar com a coactivador transcripcional (Yang et al. 1996).

S'ha descrit que PCAF interacciona amb SRC-1, un coactivador de receptors nuclears per aquest mateix domini de la regió amino (aa 121-242). Aquesta zona d'interacció conté una regió amb activitat E3-ubiqüitina lligasa (E3-Ub lligasa). Més endavant, la regió aa350-445 presenta activitat ubiqüitina lligasa implicada en l'auto-ubiqüitinització de la proteïna. Aquesta regió es superposa amb la seqüència NLS (aa428-445) (Linares et al. 2007).

La **regió carboxil** presenta una homologia del 65% amb GCN5, i està implicada en la remodelació de la cromatina. Conté el domini catalític HAT (aa550-623), on s'ha descrit la unió a E1A (Reid et al. 1998). També trobem en aquesta regió un bromodomini (aa740-810).

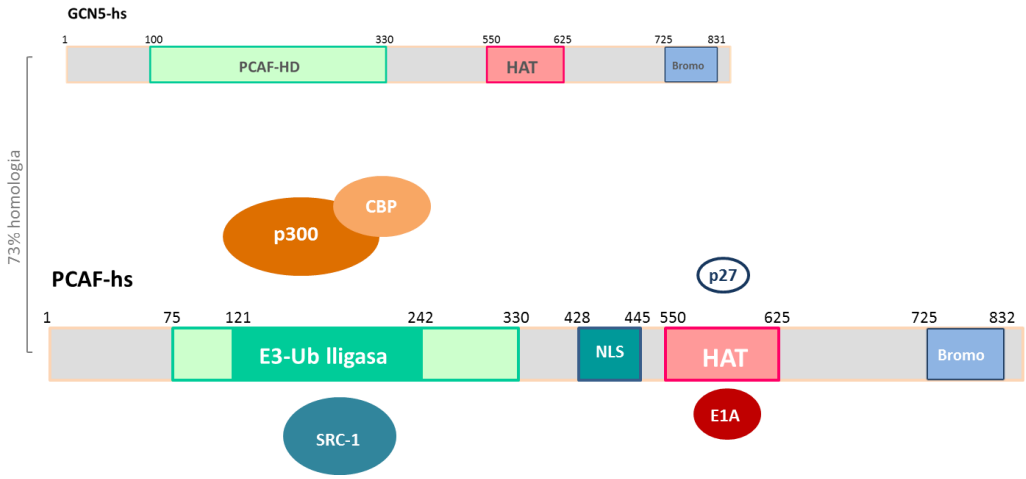


Figura 7. Esquema dels principals dominis estructurals de PCAF i les principals proteïnes que hi interaccionen.

La **regulació de PCAF** depèn del seu propi estat d'acetilació, p300, però no CBP, pot acetilar-la, fet que n'incrementa l'activitat HAT sobre la histona H3. A més PCAF pot auto-acetilar-se, i l'auto-acetilació pot ser intra- o inter-molecular (Santos-Rosa et al. 2003). L'acetilació inter-molecular és duta a terme per l'extrem amino, que acetilarà a una altra molècula de PCAF. La intra-molecular es dóna en 5 lisines situades en la seqüència NLS, regulant-ne la seva localització subcel·lular. Si a PCAF li manca el domini HAT o està deacetilada per HDAC3, s'acumula en el citoplasma (Blanco-García et al. 2009).

- **PCAF i transcripció**

Les HAT actuen en complexes multiproteics amb varis coactivadors transcripcionals i proteïnes reguladores de la transcripció. PCAF i GCN5 no es troben dins el mateix complex, però les proteïnes que els formen són similars, fet que suggereix que PCAF i GCN5 tenen funcions equivalents. Hi ha 3 nivells pels quals aquests complexes amb GCN5 o PCAF regulen la transcripció (**Figura 8**) (Nagy & Tora 2007).

Primer de tot, els complexes que contenen GCN5 i PCAF regulen els nivells globals d'acetilació de les histones. Mantenen una acetilació basal global, que desapareix quan es disminueixen els nivells de GCN5 (*knockdown*) i es veu augmentada al augmentar l'expressió de GCN5 (**Figura 8A**).

En segon lloc, els complexes amb GCN5 o PCAF interaccionen i són reclutats per activadors transcripcionals o proteïnes del cicle cel·lular (que són, receptors nuclears IRF, IFN, STAT, GAGA, HSF, Smad, Myc i E2F) a promotors específics. Un cop l'activador s'ha unit a la cromatina reclutarà els complexes HAT, per interacció directa amb la subunitat TRRAP o altres subunitats dels complexes. Els activadors també reclutaran altres complexes remodeladors de la cromatina dependents d'ATP. D'aquesta forma es facilita la unió amb TFIID i altres factors de transcripció, incloent la RNAPol II, facilitant així la transcripció del gen (**Figura 8B**).

En tercer lloc, els complexes dels que formen part GCN5 o PCAF regulen la transcripció per l'acetilació directe de factors de transcripció. Aquesta regulació pot ser activadora o repressora. Tindrà un efecte positiu sobre la transcripció quan l'acetilació del factor de transcripció estimula: la seva localització nuclear o n'inhibeix la seva exportació nuclear, quan estimula l'estabilitat o l'augment de la seva unió al DNA, o un increment en l'associació del coactivador. En canvi, si els

efectes de l'acetilació són els contraris aleshores hi haurà una repressió en la transcripció (Nagy & Tora 2007) (**Figura 8C**).

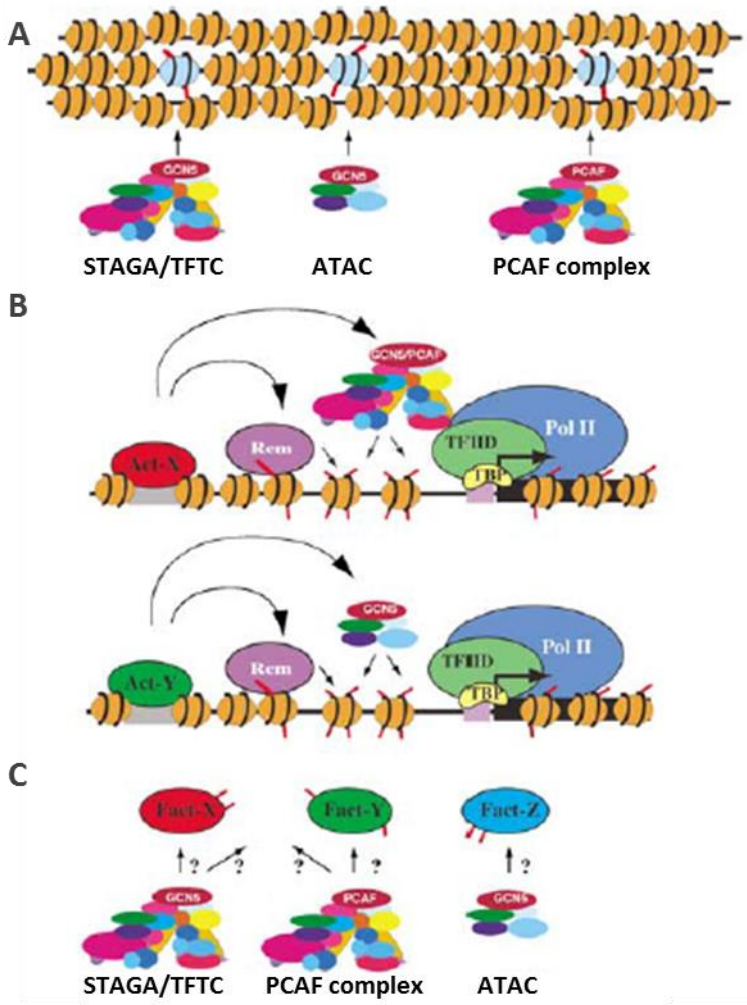


Figura 8. Model de la regulació de la transcripció pels complexes que contenen GCN5 o PCAF. (**A)** Acetilació global. Els complexes STAGA/ATAC, ATAC i PCAF contribueixen a la integritat estructural dels cromosomes i a l'acetilació dels ORF (*Open Reading Frame*). **(B)** Els complexes amb GCN5 o PCAF com a coactivadors de gens específics. Són reclutats junt amb Rem per activadors específics. **C)** Els complexes amb GCN5 o PCAF regulen la transcripció acetilant directament factors de transcripció. (Nagy & Tora, 2007).

Curiosament, s'han descrit moltes dianes no-histones per a PCAF, i per a p300/CBP però no gaires per a GCN5. Podem agrupar les dianes no-histones de PCAF relacionades amb la transcripció en: proteïnes associades a la cromatina (HMG17), factors de transcripció que regulen gens del cicle cel·lular (p53, E2F i c-Myc) i factors de transcripció generals (TFIIE i TFIIF) o específics (MyoD i Tat).

HMG17 és una proteïna associada a la cromatina que participa en la seva descondensació i per tant estimula la transcripció. Es creu que la HMG17 acetilada per PCAF disminueix l'afinitat amb la que s'uneix a la cromatina (Herrera et al. 1999).

PCAF i p300/CBP uneixen i acetilen **p53** en el seu extrem carboxil. p53 és un important factor de transcripció en la resposta al dany a DNA, encara que també està implicada en l'apoptosi, el cicle cel·lular i el metabolisme. S'ha vist que la p53 acetilada presenta un augment en la seva afinitat per unir-se a seqüències específiques del DNA. També s'ha observat un augment en els nivells d'acetilació de p53 quan hi ha dany al DNA. D'altra banda, PCAF ubiqüitinitza **Hdm2**, una E3 ubiqüitina lligasa que controla l'estabilitat de p53 al ubiqüitinitzar-la. Per tant, PCAF a part d'acetilar p53, desestabilitza i envia a degradar a Hdm2 fet que augmenta l'estabilitat de p53, que activarà la transcripció dels seus gens diana, entre els quals tenim la CKI $p21^{CIP1}$ (Linares et al. 2007; Schiltz & Nakatani 2000; Love et al. 2012).

Els factors de transcripció E2F són responsables de l'activació de l'expressió de gens involucrats en la transició G1/S del cicle cel·lular així com, activadors de la mort cel·lular per apoptosis en resposta al dany del DNA o a l'activació d'oncogens. S'ha descrit que PCAF acetila **E2F1** un membre de la família E2F, i que aquesta acetilació li confereix més estabilitat en resposta al dany al DNA, estimulant doncs la transcripció dels seus gens diana (Ianari et al. 2004).

PCAF, així com GCN5 i Tip60, són les responsables de l'acetilació de **c-Myc**, un factor de transcripció que s'activa per mitògens via MAPK/ERK i activa processos de proliferació, creixement cel·lular, apoptosis i d'auto-renovació en cèl·lules mare, és considerat un important oncogen. L'acetilació li confereix estabilitat (Patel et al. 2004).

S'ha vist que PCAF, així com p300 i TAFII250, acetilen factors de la maquinària transcripcional de la RNA polimerasa II, concretament al **TFIIEβ** i al **TFIIF**, tot i que aquestes acetilacions no s'han relacionat amb canvis en la transcripció dels seus gens diana (Imhof et al. 1997).

MyoD és un activador transcripcional específic de les cèl·lules musculars. Durant la miogènesi, MyoD s'associa als promotors de p21 i d'altres gens específics del teixit muscular. S'ha descrit la unió de PCAF i p300/CBP amb MyoD, però només PCAF l'acetila, fet que incrementa la seva afinitat pels promotors (Puri et al. 1997; Sartorelli et al. 1999).

Finalment, també s'ha descrit l'acetilació de **Tat**, un transactivador del promotor del VIH, per PCAF i p300. Per a que s'activi la transcripció, PCAF s'uneix a Tat a través del seu bromodomini i l'acetila (Dorr et al. 2002; Mujtaba et al. 2002).

- **PCAF, cicle cel·lular i diferenciació**

Molts dels factors de transcripció acetilats per PCAF tenen com a gens diana, gens implicats en el cicle cel·lular. Però, darrerament, també s'ha vist que PCAF interacciona amb components de la maquinaria reguladora del cicle cel·lular.

PCAF acetila, també ho fa p300, al supressor tumoral retinoblastoma **pRb**, Aquesta acetilació destorba la capacitat del complex ciclina E/CDK2 de fosforilar-lo eficientment, fet necessari per al correcte progrés del cicle cel·lular. Això es correlaciona amb les dades obtingudes en mioblasts i monòcits en diferenciació, que presenten una aturada del cicle cel·lular i on s'observa un increment del pRB acetilat (Nguyen et al. 2004; Glozak et al. 2005).

També s'ha descrit la interacció de PCAF amb **CDK2**. Concretament, PCAF acetila a CDK2 en la K33, un residu localitzat en el centre catalític de la quinasa i que és necessari per a la interacció amb l'ATP, per tant la CDK2 acetilada romandrà inactiva. D'altra banda, l'acetilació de CDK2 afecta la seva interacció amb la ciclina A. Per això, l'acetilació de la CDK2 produeix una aturada del cicle cel·lular en la fase S i G2/M (Mateo et al. 2009).

En els últims anys s'ha demostrat que PCAF i p300/CBP són responsables de la regulació de la condensació dels cromosomes durant la mitosi. S'ha demostrat que al silenciar les HAT disminueixen els nivells de condensines produint mitosis aberrants (Ha et al. 2009).

Finalment, en el nostre laboratori s'ha descrit que PCAF interacciona amb **p27** i l'acetila.

- **PCAF i càncer**

PCAF té un paper dual en la regulació de la viabilitat cel·lular. Se l'ha definit com a un supressor tumoral que disminueix la viabilitat cel·lular (Schiltz & Nakatani 2000). PCAF acetila i activa el supressor tumoral p53 en resposta a dany al DNA (Liu et al. 1999), és un coactivador de p73 (Zhao et al. 2003), i promou l'apoptosi

via Bax al acetilar el C-terminal de Ku70 (Cohen et al. 2004). Però PCAF també actua com un potenciador del desenvolupament dels tumors incrementant la viabilitat cel·lular: l'acetilació de l'oncogen c-Myc per PCAF l'estabilitza (Patel et al. 2004), l'acetilació del supressor tumoral PTEN per PCAF en redueix la seva funció (Okumura et al. 2006) i l'acetilació de la β-catenina l'estabilitza fent de PCAF una diana potencial en les malalties relacionades amb alteracions de la via de la β-catenina (Ge et al. 2009). En els darrers anys també s'ha definit el paper de PCAF en diverses vies de senyalització implicades en la oncogènesi.

S'ha observat que PCAF potencia la senyalització duta a terme per TGFβ/Smad unint-se a Smad3 (Itoh et al. 2000). Arran d'aquest fet, es va descriure el paper de PCAF en la promoció de la resposta apoptòtica a través de TGFβ, que s'activa gràcies a la via de senyalització pRb-E2F1-PCAF (Korah et al. 2012). En pacients de càncer de mama s'han relacionat uns nivells elevats de p21 amb una baixa supervivència. S'ha demostrat que TGFβ indueix l'expressió de p21 de forma Smad3 dependent, i es va veure que, mentre TGFβ no indueix l'associació de p21 i p300/CBP, si que promociona la formació del complex p21/PCAF, que junt amb Smad3 regularan l'activitat transcripcional de TGFβ en cèl·lules mamàries (Dai et al. 2012).

Aquest darrer any es va definir la implicació de PCAF en la via de senyalització del factor de transcripció GLI1, l'expressió del qual està regulada per diverses cascades oncogèniques, incloses les vies de HEDGEHOG, RAS, EGFR i TGFβ. Per a l'activació de la resposta transcripcional de TGFβ es necessita GLI1/Smad4, GLI1 al seu torn interacciona amb PCAF que es troba formant un complex amb Smad2. La unió d'aquests complexes als promotors dels gens induïbles per TGFβ (IL7, CICLINAD, BCL2) incrementarà l'acetilació en la histona H3K9 que resultarà en l'activació transcripcional d'aquests gens (Nye et al. 2014). Per altra banda, l'activitat E3 ubiqüitina lligasa de PCAF promourà la proteòlisi de GLI1 en resposta al dany cel·lular, regulada per p53 (Mazzà et al. 2013). D'aquesta forma PCAF exerceix un control dual en GLI1 que dependrà de les condicions microambientals i/o de l'estat de p53. L'activació de la via de HEDGEHOG-GLI1 també dependrà de la interacció de GLI1 amb PCAF.

Degut al paper de PCAF en l'activació d'aquestes vies de senyalització oncogèniques, PCAF s'ha proposat com a diana terapèutica per al tractament del càncer (Malatesta et al. 2013; Infante et al. 2014). Ja en el 2005 es van descobrir dos inhibidors (CCT077791 i CCT077792) de PCAF i p300 que inhibien l'acetilació i el creixement en cèl·lules de càncer de còlon HCT116 i HT29 (Stimson et al. 2005).

HIPÒTESI I OBJECTIUS

Hipòtesi de treball

En el nostre laboratori s'ha demostrat una interacció directa entre p27 i l'acetiltransferasa PCAF. Aquesta interacció es produeix entre el domini HAT de PCAF i la regió que conté els aa 91-120 de p27. Aquesta regió de p27 conté un PRD (*Proline Rich Domain,* 91-96aa) domini característic d'interacció entre proteïnes (Pérez-Luna et al., 2012). Hem comprovat que PCAF acetila la lisina en posició 100 de p27 (Pérez-Luna et al., 2012).

PCAF és un coactivador transcripcional que actua acetilant histones o factors de transcripció. Per altra banda, recentment s'ha descrit que p27 també actua com a regulador transcripcional, bàsicament com a repressor de la transcripció de determinats gens diana. Així doncs, com que PCAF acetila p27 plantegem com a hipòtesi de treball que PCAF i p27 actuen conjuntament en la regulació transcripcional de determinats gens diana.

Objectius del treball:

L'objectiu general del treball és confirmar la hipòtesi de que PCAF i p27 col·laboren en la regulació de la transcripció de gens específics.

Objectius concrets:

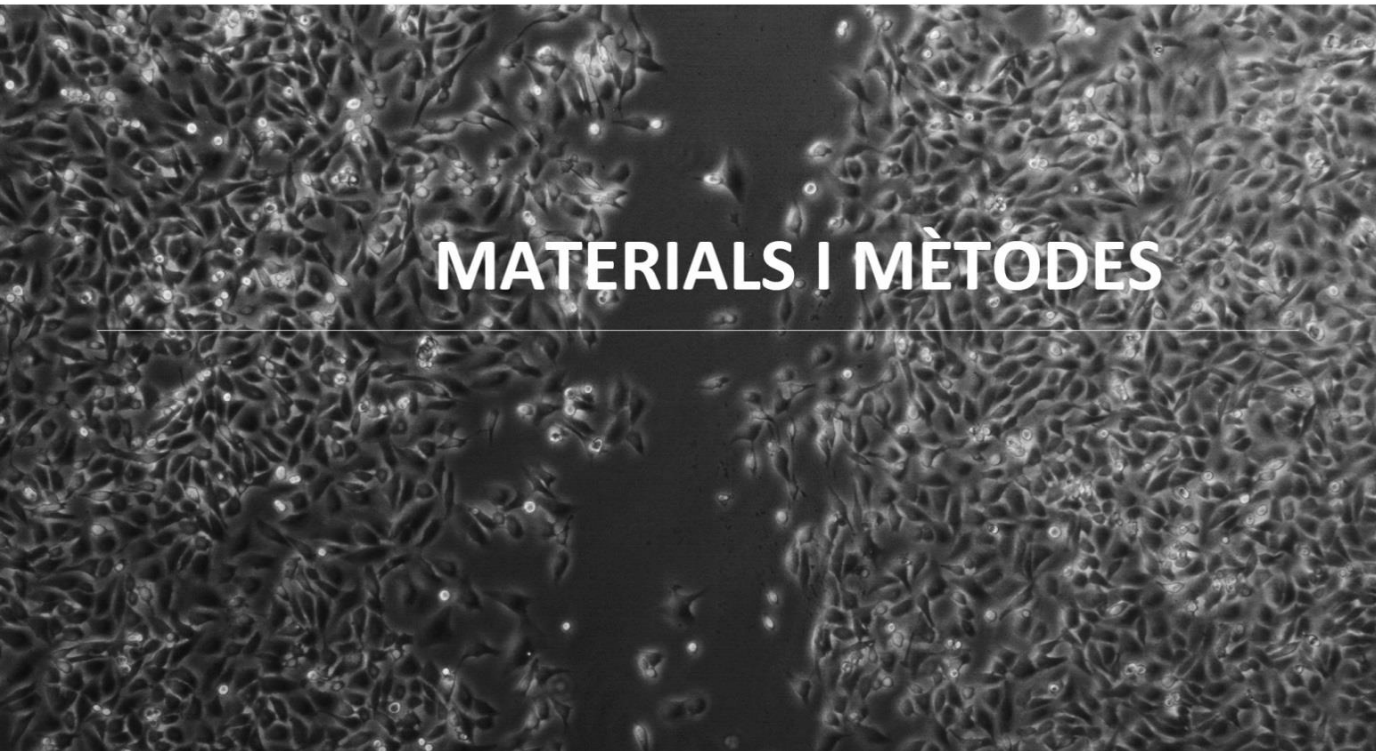
1) Anàlisi funcional de l'acetilació de p27 sobre la regulació transcripcional

2) Identificació dels programes transcripcionals regulats per p27 i PCAF

3) Identificació de gens diana comuns a p27 i PCAF

4) Anàlisi de la expressió de gens diana de p27 i PCAF

5) Anàlisi dels mecanismes de la regulació transcripcional per p27



MATERIALS I MÈTODES

1. Tècniques de Biologia Molecular

1.1. Plasmidis utilitzats

- pECFP-C1 (Clontech): vector d'expressió en eucariotes de 4,7 Kb, que conté la seqüència de la proteïna ECFP a l'extrem 5' de la regió de policlonatge. Aquesta proteïna té la propietat d'emetre llum fluorescent de color cian, ja que emet llum a una longitud d'ona de 477 nm quan és excitada a una longitud d'ona de 434 nm.

- pEYFP-C2 (Clontech): vector d'expressió en eucariotes de 4,7 Kb, que conté la seqüència de la proteïna EYFP a l'extrem 5' de la regió de policlonatge. Aquesta proteïna té la propietat d'emetre llum fluorescent de color groc, ja que emet llum a una longitud d'ona de 527 nm quan és excitada a una longitud d'ona de 514 nm.

- pLKO.1-puro (Sigma-Aldrich): vector lentiviral per l'expressió de shRNA. Conté un gen de resistència a la puromicina, que permet seleccionar cèl·lules eucariotes transfectades amb aquest plasmidi i un gen de resistència a l' ampicil·lina, per a la seva selecció en cultius bacterians. Es van adquirir a Sigma-Aldrich els plasmidis shRNA de shPCAF i shp27 (5 diferents per cadascun) d'humà i un shRNA *random* de control (sh(-)).

- pUC-57 (Genscript): es van comprar a Genscript plasmidis amb el cDNA de p27WT, p27K13R, p27K100R, p27K3R, p27K5R i p27Δ91-120. Totes aquestes seqüències van ser posteriorment clonades en vectors pECFP-C1 (Clontech) i/o pEV833.

- pEV833: vector d'expressió lentiviral. Amablement cedit pel Dr. Eric Verdin (Gladstone Institutes, San Francisco).

- pVSVG: plasmidi que codifica per les proteïnes de l'embolcall viral, Clontech.

- pCMVΔR8.91: plasmidi que codifica pels gens virals gag i pol, ambdós necessaris per a la producció de partícules víriques en el cas d'utilitzar vectors lentivirals. Va ser amablement cedit pel Dr. Didier Trono.

- pGL3-*promoter vector*: vector luciferasa d'expressió en eucariotes de 5,01Kb, que conté un promotor viral constitucionalment actiu (SV40) i el gen de la luciferasa a continuació.

- pCMV: vector d'expressió del gen de la β-galactosidasa.

1.2. Subclonatges

Els plasmidis pECFP, pEYFP, pEV833 i pGL3 han estat utilitzats com a vectors receptors per a clonar diferents cDNAs (**Taula 4**).

Taula 4. Construccions de cDNA emprades en aquesta tesi.

Plasmidi	cDNA	Procedència
CFP-p27WT	p27 Kip1	Dra. Pérez Luna
CFP p27 Δ 91-120	p27 Δ 91-120	Dra. Pérez Luna
CFP-p27 K13R	p27 K13R	Aquesta Tesi
CFP-p27 K100R	p27 K100R	Aquesta Tesi
CFP-p27 K3R	p27 K3R	Dra. Pérez Luna
CFP-p27 K5R	p27 K5R	Dra. Pérez Luna
YFP-Flag-PCAF	Flag-PCAF	Dra. Pérez Luna
pcDNA3.1 Flag-Ct PCAF	GFP-Flag-PCAF(352-832)	Dra. Martínez-Balbás
pEV833-p27	p27 Kip1	Dra. Gallastegui
pEV833-PCAF	PCAF	Aquesta Tesi
pGL3-ROBO1-p27	pic ROBO1 ChIP-seq p27	Aquesta Tesi
pGL3-GRIN3A-p27	pic ROBO1 ChIP-seq p27	Aquesta Tesi
pGL3-GRIN3A-PCAF	pic ROBO1 ChIP-seq PCAF	Aquesta Tesi

El procediment general seguit per als subclonatges és:

- Es fa créixer en medi LB (Luria-Bertani) líquid un inòcul procedent de bacteris DH5α competents (produïts en el nostre laboratori) transformats amb el vector d'origen d'interès, afegint l'antibiòtic que es requereix per a la selecció del plasmidi.

- Es purifica el DNA plasmídic del cultiu bacterià, emprant tècniques de purificació de DNA plasmídic, seguint el protocol del kit comercial (Qiagen).

- Es fan les digestions necessàries amb els enzims de restricció que correspongui, seguint les pautes recomanades per a cada enzim, tant del plasmidi origen amb l'insert com del plasmidi receptor, on volem subclonar l'insert.

- Mitjançant un gel d'agarosa, es corren les diferents mostres generades amb les digestions. Es retallen les bandes resultants que corresponen a l' insert i al vector receptor i es purifica el DNA, utilitzant kits comercials d'extracció de DNA (Qiagen).

- Es prepara la reacció de lligació utilitzant lligasa T4 (Invitrogen) segons el kit. Es deixa reaccionar durant tota la nit a 16ºC amb la finalitat que es produeixi la lligació desitjada.

- Es transforma la lligació en bacteris DH5α competents, es purifica el DNA plasmídic obtingut i es comprova si s'ha produït la lligació requerida, mitjançant digestions amb enzims de restricció. Cal analitzar el patró de restricció obtingut mitjançant gels d'agarosa i, determinar si la mida dels fragments generats és coherent amb la lligació desitjada.

1.3. Transformació bacteriana

- Es descongelen els bacteris competents en gel.

- S'afegeixen 0,5-1 µg de DNA plasmídic en 100 µl de cèl·lules competents; la mescla s'incuba en gel durant 30 min.

- Es realitza un xoc tèrmic sotmetent la mostra a 42ºC durant 45 segons i, acte seguit, es diposita en gel durant 2 min.

- S'afegeix 1 ml de medi LB sense antibiòtic a la mostra i s'incuba durant 1h a 37ºC, en agitació.

- Es centrifuga la mostra durant 1 min a 6000 rpm en una microfuga i s'eliminen 900 µl del sobrenedant. Amb la resta del medi es resuspenen les cèl·lules i es plaquegen en medi LB-agar amb l'antibiòtic adequat, segons sigui la resistència del plasmidi transformat.

- S'incuba la placa durant la nit, a 37ºC, esperant la formació de colònies bacterianes resistents, les quals probablement contindran el plasmidi d'interès. Paral·lelament, és convenient realitzar una placa control, en la qual haurem sembrat cèl·lules competents sense transformar amb DNA plasmídic.

1.4. Aïllament de DNA genòmic

Utilitzarem aquesta tècnica per a dos objectius, primer per a obtenir cDNA genòmic de les cèl·lules HCT116 que utilitzarem de motlle en les PCRs. A partir d'una placa de cultiu cel·lular (60mm de diàmetre) recollim les cèl·lules HCT116 i n'extraiem el DNA seguint les indicacions del Nucleospin Tissue kit (Macherey Nagel).

En segon lloc, quan aïllem fibroblasts embrionaris de ratolins heterozigots, ja que les femelles $p27^{-/-}$ són estèrils, necessitem genotipar-los. Per a aquest objectiu utilitzem els caps dels embrions aïllats (25mg de teixit) per a l'extracció del DNA amb el Nucleospin Tissue kit, seguint les instruccions del fabricant. El DNA extret s'utilitzarà per a fer una PCR de validació.

1.5. Clonatge de les seqüències d'unió a cromatina de p27 i PCAF

Dissenyem amb l'ajuda dels programes informàtics, Genome Browser i Primer3, els *primers* adjacents a les seqüències del ChIP-seq de p27 pel gen ROBO1, regió chr3:79257543-79257776, i de GRIN3A, regió chr9: 103520403-103520670, i del ChIP-seq de PCAF, la regió chr9: 103539425 -103539691 del gen GRIN3A. En els extrems d'aquests *primers* hi incloem les dianes dels enzims de restricció necessàries per al seu clonatge en el vector pGL3-*promoter vector*.

Utilitzem aquests *primers* i DNA genòmic de HCT116 (obtingut com es descriu en l'apartat 1.4) per a produir les seqüències desitjades mitjançant una PCR (Expand High fidelity PCR System, Roche) seguint els següents passos: 2min 97ºC; (1min 95ºC, 1 min 54ºC i 1 min a 72ºC) 9 vegades; (1 min a 95ºC, 1 min a 64ºC i 1 min a 72ºC) 29 vegades; 10 min a 72ºC i 15ºC *forever*.

Un cop produït l'insert d'interès procedirem al seu subclonatge en el vector pGL3-*promoter vector*, seguint el protocol descrit en l'apartat 1.2., que utilitzarem en els assaigs de luciferasa.

2. Cultius cel·lulars

En aquesta Tesi s'han utilitzat els següents models cel·lulars:

HCT116: línia tumoral procedent de càncer colorectal humà.

HEK 293T: línia immortalitzada procedent de ronyó embrionari humà.

HeLa: línia tumoral procedent de càncer de cèrvix humà.

NIH3T3: línia immortalitzada de fibroblasts de ratolí

MEF wt: línia primària de fibroblasts embrionaris de ratolí.

MEF KO p27: línia primària de fibroblasts embrionaris de ratolí p27 KO.

MEF KO p27CK-: línia primària de fibroblasts embrionaris de ratolí p27 CK-.

2.1. Manteniment de cèl·lules en cultiu

Els cultius cel·lulars emprats en aquesta tesi s'han mantingut en incubadors a 37ºC i a una pressió parcial de CO_2 del 5%. Els cultius s'han manipulat en condicions d'esterilitat: en una campana de flux laminar i utilitzant material autoclavat, exclusiu per l'ús de cultius.

Els medis de cultiu utilitzats per al manteniment de les diferents línies cel·lulars, són els següents:

- Per al manteniment de les línies MEFs, HeLa i HEK293T hem utilitzat el medi Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) de Biological Industries suplementat amb 2mM de L-glutamina (Merk), 1% d'aminoàcids

no essencials (Biological Industries), 1mM de d'àcid pirúvic (Sigma), antibiòtics: 50 unitats/ml de penicil·lina + 50 μg/ml d'estreptomicina (Biological Industries) i 10% de Fetal Calf Serum (FCS) (Biological Industries).

- La línia HCT116 ha estat mantinguda amb el medi DMEM-HAM F12 (Biological Industries) en proporció 1:1, suplementat amb els components descrits anteriorment.

- La línia NIH3T3 s'ha mantingut amb DMEM suplementat de la mateixa manera que les línies anteriors, però utilitzant 10% de Donor Calf Serum (DCS) (Biological Industries).

2.2. Aïllament de fibroblasts embrionaris de ratolí

Els fibroblasts embrionaris de ratolí (MEF) es preparen a partir d'embrions de 13.4-14.5 dies. S'extreuen els embrions de femelles de ratolí C57BL/6 wt o $p27^{-/+}$ (les femelles $p27^{-/-}$ són estèrils). Un cop s'han retirat el cap i els òrgans interns, els embrions són sotmesos a disgregació física amb l'ajuda d'un bisturí. S'afegeixen 500μl de tripsina, es pipeteja amunt i avall i s'incuba 15min a 37ºC, es repeteix aquest pas. S'atura la digestió per tripsina afegint DMEM al 10% FCS i es centrifuga a 1.000 rpm 5 min. Les cèl·lules del pèl·let són plaquejades en plaques de cultiu (100mm de diàmetre). A les 24 hores de cultiu, quan les cèl·lules han assolit una confluència del 80-90%, es passen a 4 plaques de les mateixa dimensió. Aquest passatge es considera el primer, per als experiments duts a terme en aquesta Tesi s'han utilitzat MEFs amb un màxim de 3-4 passatges.

2.3. Sincronització de cèl·lules en quiescència

Amb l'objectiu de sincronitzar en quiescència cultius cel·lulars de HeLa, NIH3T3, HCT116 o MEF, vam partir de cultius confluents mantinguts amb medi de creixement sense sèrum. En el cas de les cèl·lules HeLa i MEFs, aquestes van ser privades de FCS durant 72 hores; les NIH3T3 i HCT116 van ser privades de sèrum durant 48 hores. Després del temps de privació de sèrum, els cultius van ser recollits (G0=0h) o replantats, obtenint una confluència del 50%, amb el medi de creixement adequat per a cada línia cel·lular, per tal de permetre l'entrada al cicle cel·lular. Les cèl·lules van ser recollides als temps de sincronització desitjats basant-

nos en experiments de FACS (Fluorescence-activated cell sorting), duts a terme en el nostre laboratori amb aquestes línies cel·lulars (dades anteriors a aquesta Tesi).

2.4. Inhibició de la síntesi i la degradació de proteïnes

Per tal de determinar la vida mitja de PCAF, és a dir, el temps que triga a degradar-se el 50% de la quantitat total de la proteïna, hem tractat les cèl·lules MEFs amb 10 µg/ml de cicloheximida (Sigma), hem recollit mostres a diferents temps, de 0 a 32 h post-incorporació de la cicloheximida, i processem les mostres per a Western blot. Aquest producte és un inhibidor de la síntesi proteica, de manera que a partir del moment en que la incorporem en el medi podrem seguir la velocitat de degradació de proteïnes concretes.

Per tal de monitoritzar la via de degradació de PCAF, tractem les cèl·lules amb inhibidors de proteasoma, ALLN (100nM) o MG-132 (50nM) durant 16 hores, després es recullen les cèl·lules i es realitza el Western blot.

2.5. Transfecció de cèl·lules

Mitjançant la tècnica de transfecció de cèl·lules podem expressar una determinada proteïna en una línia cel·lular concreta. Aquesta metodologia consisteix en la introducció d'un plasmidi amb el cDNA d'una proteïna específica. Existeixen diferents sistemes de transfecció, però el que hem utilitzat en aquesta Tesi es basa en la inclusió de molècules de DNA en liposomes, els quals es fusionen amb la membrana plasmàtica i lliuren l'àcid nucleic a l'interior de la cèl·lula.
Segons la línia cel·lular, hem emprat un agent de transfecció o altre. En el cas de les cèl·lules HCT116 i NIH3T3, hem utilitzat Lipofectamina-2000 (Invitrogen), i per a la transfecció de HEK293T hem utilitzat Polyfect (Qiagen) o CalPhos Mammalian Transfection kit (Clontech). Per a la manipulació dels diferents productes hem seguit el protocol indicat pel fabricant, tot i que en alguns experiments hem ajustat la quantitat de DNA i d'agent transfectant, per optimitzar l'eficiència de la transfecció.

En els experiments en els quals s'han transfectat vectors fluorescents (CFP, YFP) visualitzem, a les 24 hores post-transfecció, les cèl·lules al microscopi de fluorescència (Axiovert 200M (Zeiss)), per a controlar l'eficiència de la transfecció.

2.6. Obtenció de cultius cel·lulars *knockdown* de p27 o PCAF

Per tal de generar línies cel·lulars *knockdown* (kd) de PCAF o p27, les quals tenen nivells reduïts de les proteïnes esmentades, utilitzem cultius asincrònics de HCT116 que són infectats amb els plasmidis pLKO.1-puro-control (sh(-)), pLKO.1-puro-p27 (shp27) i pLKO.1-puro-PCAF (shPCAF) produïts en HEK293T. A les 24h seleccionem les cèl·lules infectades per adició de puromicina (Sigma-Aldrich) al medi a una concentració de 10 µg/ml durant una setmana. Els cultius es mantenen habitualment en medi de creixement amb puromicina (10 µg/ml). Per comprovar si els nivells endògens de p27 o PCAF han disminuït per efecte dels shRNAs, analitzem els seus nivells per Western blot.

- **Producció i infecció lentiviral:**
  - Transfecció de HEK293T (10µg shRNA d'interès, 15 µg pCMVΔR8.91 i 5 µg pVSVG)
  - A les 48 hores es recull el medi on s'estan produint els virus i es guarda a 4ºC.
  - A les 72 hores es torna a recollit el medi amb virus i junt amb el medi del dia anterior es filtra (0,45µm, Millex) i es fa un gradient amb 4ml de sacarosa al 20%. Es centrifuga a 26.000 rpm per 1h 30min.
  - El pel·let obtingut es dilueix en 1ml de medi i s'utilitza per infectar les cèl·lules HCT116 junt amb Polybrene (5µg/ml, Sigma-Aldrich)

2.7. Obtenció de lisats cel·lulars i quantificació de proteïna total

Per tal d'obtenir lisats a partir de cultius cel·lulars, hem seguit la metodologia següent:

- Es retira el medi de les plaques de cultiu i es fa un rentat amb (PBS *Phosphate Buffered Saline:* 10 mM tampó fosfat pH 7,2 i 150 mM NaCl).

- S'afegeix el volum de PBS necessari per cobrir la superfície de la placa i, en fred, es rasca el cultiu per a desprendre les cèl·lules adherides a la placa, utilitzant un *scraper*. Aquest pas també l'hem fet afegint tripsina (Gibco) a la placa de cultiu, utilitzant el volum necessari per a cobrir la superfície de la

placa o flascó. Es deixa actuar la tripsina fins un temps màxim de 3 minuts, deixant el cultiu dins d'un incubador a 37ºC. A continuació, aquesta es neutralitza afegint el medi de creixement amb sèrum. Després de la neutralització es centrifuguen les cèl·lules a 2.000 rpm, durant 5 minuts a 4ºC.
En el cas de desadherir les cèl·lules amb *scraper*, aquestes es recullen en tubs prèviament mantinguts en gel i es centrifuguen a 2000 rpm, durant 5min a 4ºC.

- Es descarta el sobrenedant i es fa un rentat resuspenent el sediment amb PBS. Es torna a centrifugar, tal i com s'ha explicat anteriorment.

- Es descarta el sobrenedant i es resuspèn el sediment utilitzant el tampó de lisi necessari segons l'experiment. En aquesta Tesi hem utilitzat els tampons següents: HAT, RIPA, CoIP o Tris-SDS.

- a) Si hem lisat amb tampó HAT o RIPA: incubem els lisats durant 30 min en gel. Després els centrifuguem durant 10 min, a 4ºC i 14000 rpm en una microfuga. Tot seguit guardem el sobrenedant i descartem el sediment.
  b) Si hem lisat amb Co-IP: 15 min a RT(*room temperature*) amb DNAsa i 20 min en la nòria a 4 ºC. Centrifuguem a 2.000 rpm, 5min a 4ºC, i recollim el sobrenedant.
  c) Si hem lisat amb tampó Tris-SDS: 30 min a 95 ºC, 10 min a 14.000 rpm a 4 ºC (per extreure el SDS) i recollim el sobrenedant.

- Tot seguit, quantifiquem la concentració de proteïna present als extractes cel·lulars pel mètode de Lowry (DC™ Protein Assay, BioRad) i es llegeix l'absorbància (Ab= 750nm) amb el lector de plaques Synergy 2 (Biotek).

- Els tampons de lisi s'han escollit en funció de l'experiment:
  - Per a detectar acetilacions, hem lisat amb RIPA.
  - Als experiments on s'han realitzat immunoprecipitacions (IPs) per a detectar interaccions entre proteïnes, hem lisat amb Co-IP o HAT.
  - Per a detectar els nivells de proteïnes per WB, hem lisat amb tampó Tris-SDS.

Tampó de lisi Tris-SDS: 80mM Tris pH 6.8, 2%SDS.

Tampó de lisi HAT: 500 mM Tris-HCl pH 6.8 (4ºC), 50% glicerol, 500 mM KCl, 1mM EDTA i afegim al moment de l'ús (0,5%) Igepal.

Tampó de lisi RIPA: 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40 (Igepal), 0,5% deoxicolat sòdic, 0.1% SDS, 1 mM EDTA

Tampó de lisi Co-IP: en PBS (Sigma), 1mM EDTA, 100µM Na_3VO_4, 0.5% Tritó X-100, 20mM β-Glicerol fosfat i 0.2mM PMSF.

Afegim al moment de l'ús els inhibidors de proteases, de fosfatases i de deacetilases (aquest últim només en els experiments d'acetilació):

Inhibidors de proteases: 1 mM PMSF, 0,5 µg/µl Aprotinina, 10 µg/µl Leupeptina i PIC (*Protease Inhibitor Cocktail*, Roche).

Inhibidors de deacetilases: TSA (Tricostatina A, Sigma) 3,3µM.

Inhibidors de fosfatases: 0,1 mM Ortovanadat i 500 mM Florur sòdic.

3. Electroforesi, electrotransferència i immunodetecció de proteïnes

3.1. Electroforesi de proteïnes (SDS-PAGE)

Amb la finalitat de separar proteïnes en funció de la seva mida o pes molecular, s'utilitzen gels de SDS-poliacrilamida en condicions desnaturalitzants (SDS-PAGE) seguint el mètode de Laemmli (LAEMMLI 1970). Aquesta metodologia permet separar les proteïnes desnaturalitzades amb SDS, en funció de la seva mobilitat electroforètica, quan es desplacen a través d'una matriu d'acrilamida i bis-acrilamida impulsades per la força d'un camp elèctric.

Les molècules de SDS s'uniran a les proteïnes en una quantitat proporcional a la mida de la proteïna, de manera que la relació massa/càrrega de les diferents proteïnes és la mateixa. D'aquesta manera, totes les proteïnes són atretes cap al pol positiu del camp elèctric generat amb la mateixa força. No obstant, la seva velocitat de migració dependrà de la facilitat que tinguin per a migrar a través del gel, de manera que les proteïnes més petites arribaran abans que les grans al final del gel.

Preparem les mostres, lisades amb tampó Tris-SDS i quantificades, amb un tampó de mostra que conté: 2% SDS, 0,5 mg/ml DTT, 10% glicerol i 0,1 mg/ml blau de bromofenol. Abans de carregar-les al gel, les bullim 3 minuts per tal de desnaturalitzar completament les proteïnes i trencar tots els ponts di-sulfur.

3.2. Electrotransferència

És una tècnica que ens permet passar proteïnes retingudes en un gel d'acrilamida cap a una membrana de nitrocel·lulosa (BioRad), mantenint el patró de bandes generat per l'electroforesi.

La metodologia consisteix en posar en contacte el gel amb la membrana i, mitjançant un camp elèctric, les proteïnes del gel migren cap a la membrana, on quedaran retingudes. La membrana ha d'estar ubicada al pol positiu del camp i el gel amb les proteïnes, al pol negatiu. Com que les proteïnes tenen càrrega negativa perquè han estat desnaturalitzades amb SDS, migraran del gel fins la membrana, on quedaran retingudes.

3.3. Immunodetecció (*Western Blot)*

Per a la detecció de proteïnes, hem utilitzat un sistema de doble anticòs. Un anticòs primari, que reconeix i interacciona amb epítops específics de la proteïna d'interès i un anticòs secundari, específic de les immunoglobulines de l'espècie utilitzada per produir l'anticòs primari. Els anticossos secundaris emprats en aquesta tesi estan conjugats a peroxidasa (HRP, *Horseradish peroxidase*). La reacció de la Peroxidasa amb el seu substrat produeix luminescència. Per a detectar la peroxidasa utilitzem el producte EZ-ECL (Chemioluminiscence Detection Kit for HRP, Biological Industries). Exposem la membrana sobre un film fotogràfic (Hyperfilm ECL, Amersham). Passat un temps d'exposició, el film serà revelat i les bandes obtingudes indiquen la presència de la proteïna d'interès.

Els anticossos primaris utilitzats en aquest treball s'indiquen a la **Taula 5**.

Taula 5. Anticossos primaris utilitzats en aquesta tesi

Antigen	Origen	Casa comercial	Referència	Tècnica
p27	Rb	Santa Cruz	sc-528 (C-19)	IP, ChIP, WB
p27	M	BD Transduction Labs	610242	WB
PCAF	Rb	Sigma	P7493	IP, WB
PCAF	Rb	Santa Cruz	sc-8999 (H-369)	WB
PCAF	M	Santa Cruz	sc-13124 (E-8)	WB
PCAF	Rb	Abcam	ab12188	ChIP
Acetyl-Lys	Rb	Rockland Immunochemicals	600-401-939	WB
Flag	Rb	Sigma	A2220	IP, ChIP
GFP	Rb	Abcam	ab290	IP
GFP	M	Abcam	ab1218	WB
ciclina D1	M	Santa Cruz	sc-20044	WB
ciclina D1	Rb	Millipore	06-137	IP
CDK4	Rb	Santa Cruz	sc-260	WB
IgG	Rb	Sigma	I8140	IP, ChIP
Actina	M	MP Biomedicals	69100	WB
Actina	Rb	Santa Cruz	sc-10731	WB
E2F4	Rb	Santa Cruz	sc-866 (C-20)	IP
E2F4	M	abcam	ab4071	WB
PAX	Rb	Santa Cruz	sc-25408 (H-150 X)	IP, WB

M: ratolí , Rb: conill , IP: Immunoprecipitació, WB: Western blot, ChIP: Immunoprecipitació de cromatina

4. Localització de proteïnes

4.1. Immunocitoquímica per a microscòpia de fluorescència

Mitjançant aquesta tècnica es poden detectar i localitzar proteïnes específiques dins d'una cèl·lula, al expressar-les acoplades a un *tag* fluorescent (GFP, CFP, YFP), de manera que no cal utilitzar cap anticòs per a detectar-les. En qualsevol cas, el procediment que hem utilitzat per realitzar preparacions immunocitoquímiques ha estat el següent:

- Fem créixer les cèl·lules sobre cobreobjectes de vidre.

- Realitzem les transfeccions oportunes. 24 hores post-transfecció traiem el medi de les cèl·lules i fem dos rentats amb PBS 10 min (els rentats sempre seran amb PBS fred).

- Fixació incubant les cèl·lules durant 10 min a temperatura ambient (RT) amb una solució al 4% de paraformaldehid en PBS, posteriorment fem 3 rentats de 10 min amb PBS i un amb H_20 *milliQ*.

- Muntem els cobreobjectes sobre el portaobjectes afegint uns 4 µl de medi de muntatge *Mowiol* (Calbiochem). Quan s'hagi assecat el medi de muntatge podrem procedir a l'observació de les mostres amb el microscopi òptic de fluorescència o confocal (en aquesta Tesi hem utilitzat el microscopi confocal Leica TCS SP5).

4.2. Immunocitoquímica per a la detecció amb peroxidasa

Amb la finalitat de determinar el patró de localització de les proteïnes CFP-p27wt i CFP-p27K100R transfectades en NIH3T3, es van realitzar immunocitoquímiques. El procediment és el següent i va ser realitzat en col·laboració amb el Dr. Serratosa:

- Es fixen les cèl·lules amb una solució del 4% de paraformaldehid: PBS, durant 20 minuts a temperatura ambient. En aquest punt, es pot aturar el procediment, si es deixen les cèl·lules fixades amb una solució de PBS més algun agent bactericida (timerosal) a 4ºC.

- S'incuben les cèl·lules amb una solució de metanol: 0,3% de H_2O_2 durant 10 min, per permeabilitzar les membranes i bloquejar la peroxidasa endògena.

- S'incuben les cèl·lules amb una solució de PBS:10% de sèrum normal de cabra:1% de BSA, durant 20 minuts a temperatura ambient. En aquest pas, es bloquegen els llocs d'unió inespecífics.

- S'incuben les cèl·lules amb anti-GFP policlonal (1:2000) durant la nit i a 4ºC.

- S'incuben les cèl·lules amb l'anticòs secundari conjugat amb biotina i produït en cabra (1:200), durant 1 hora a temperatura ambient.

- Es fa una incubació amb Extravidin-HRP (1:500) durant 1 hora a temperatura ambient. L'extravidina és una molècula que s'uneix amb alta afinitat a la biotina. En aquest cas, utilitzem extravidina conjugada amb peroxidasa (HRP).

  Per a revelar la reacció, afegim el substrat de la peroxidasa: la diaminobenzimida (DAB). Aquesta desencadena una reacció que té com a resultat un precipitat de color marró que es diposita sobre la mostra, indicant els llocs de la cèl·lula on es localitza l'antigen d'interès; en el nostre cas, la proteïna d'interès unida a GFP.
  Els anticossos han estat diluïts en una solució de PBS amb 1% de BSA i 10% de sèrum normal de cabra.
- Les imatges s'han obtingut amb un microscopi Olympus IX70 (Olympus) i una càmera digital (CC-12, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH).

4.1.1. Comptatge de cèl·lules amb tinció nuclear o citoplasmàtica de p27

Es van utilitzar 3 pous de 366 cm^2 amb cèl·lules sembrades, per cada condició experimental.
Per a realitzar els comptatges de les cèl·lules amb tinció nuclear o citoplasmàtica, es van considerar aquelles cèl·lules que seguien els criteris definits inicialment. Es van comptar un total de 4000 cèl·lules.

5. Detecció d'interaccions proteïna-proteïna/proteïna-DNA

5.1. Immunoprecipitació de proteïnes (IP)

Per començar, es lisen les cèl·lules amb tampó HAT o Co-IP, en funció de l'experiment (apartat 2.7).

- S'incuba el lisat cel·lular (500 µg-2mg segons la quantitat de proteïna d'interès) amb 2,5-5 µg d'anticòs d'interès o control (IgG) i afegim tampó de lisi suficient per a què les mostres tinguin un volum final de 500 µl, de manera que l'agitació es pugui donar correctament. Les mostres es mantenen a 4ºC i en agitació ON (*over-night*).

- S'afegeix a les mostres 20µl de *beads* magnètiques (Dynabeads, Invitrogen), proteïna A o G segons l'anticòs utilitzat, i s'incuben en agitació, a 4ºC, durant 2 hores.

- Després de la incubació amb les *beads* magnètiques, es fan de 3 a 5 rentats de les mostres amb tampó de lisi utilitzat (en gel). En el cas del tampó HAT, s'afegeix KCl fins a assolir una concentració final de 150 mM.

- Eluïm les proteïnes unides a les *beads* afegint el tampó de mostra d'electroforesi (amb SDS). Afegim tant volum de tampó de mostra (2x) com volum de *beads* havíem utilitzat. Per tal de detectar les proteïnes immunoprecipitades, sotmetem les mostres a electroforesi seguida de *Western Blot*.

5.2. Immunoprecipitació de cromatina (ChIP) i RT-PCR

- Recollim les cèl·lules HCT116 o MEF asincròniques o en quiescència (G0) amb tripsina, són comptades i centrifugades.

- <u>Fixació:</u> El pel·let es resuspèn amb PBS i s'afegeix a una concentració final del 1% de formaldehid (Formaldehid 37%, tampó 5X (250mM Hepes, 500mM NaCl, 5mM EDTA i 2,5mM EGTA) : H_2O) durant 10 min, que mantindrà la unió dels complexes proteïna-DNA (*cross-linking*). Per a parar el *cross-linking* s'afegeix, també a una concentració final del 1%, una solució al 0.125M de glicina durant 10 minuts, i es procedeix a 2 rentats amb PBS del pel·let *cross-linked*.

- Lisis: els pel·lets són lisats (200µl tampó lisis/$1 \cdot 10^6$ cèl·lules) durant 30 minuts en gel i agitació amb el tampó de lisi següent: 10mM Tris-HCl pH 8, 0.25% Tritó X-100, 10mM EDTA, 0.5mM EGTA, 10mM butirat sòdic, 20mM β-glicerolfosfat, 100µM ortovanadat i PIC (1 pastilla/20ml). Un cop centrifuguem el lisat a 2.000 rpm durant 5min a 4ºC obtenim un pel·let nuclear amb les proteïnes unides al DNA.

- Sonicació: és netegen els pel·lets amb PBS dos vegades i es resuspèn amb el tampó de sonicació (300µl tampó sonicació/$3 \cdot 10^6$ cèl·lules) que és el següent: 10mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5mM EGTA, 10mM Butirat sòdic, 20mM β-glicerolfosfat, 100µM ortovanadat, al moment s'afegeix PIC (1 pastilla/20ml) i SDS a una concentració final del 1%. Per tal d'obtenir fragments més petits de cromatina, entre 0.5Kb i 1Kb, els lisats són sonicats durant 20 minuts (a amplitud alta), en rondes de 30 segons, amb 30 segons de descans entre ronda i ronda, utilitzant el Bioruptor Sonicator (Diagenode). L'eficiència de la sonicació s'avalua en un gel d'agarosa al 1%. Un cop obtinguts els fragments de la mida desitjada les mostres, mantingudes en gel, es centrifuguen a 14.000 rpm durant 10 min a 4ºC. El SDS es descarta i el sobrenedant es transfereix a un tub nou.

- Incubació: Mesurem la concentració de DNA de les mostres amb l'espectrofotòmetre Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). S'incuba de 100-500µg cromatina sonicada (un 10% de la mostra es separa per ser utilitzada com a input, es guarda a 4ºC) amb 2,5-5 µg de l'anticòs d'interès o de control (Flag). S'afegeix tampó de sonicació a la mostra fins assolir 1ml de volum total. Es reconverteix el tampó de sonicació en tampó RIPA afegint 100 µl Tritó 10%, 28.75 NaCl 5M i 10 µl deoxicolat sòdic (DOC) 10%. Finalment, s'afegeixen 20 µl Magna ChIP Protein A o G *beads* magnètiques (Millipore) i s'incuba en agitació a 4ºC i ON.

- Rentats: Es fan 3 rentats amb tampó de RIPA de 5 min a 4ºC, 3 rentats similars amb tampó RIPA 500mM NaCl, 2 rentats amb tampó de liti (0.25M LiCl, 1% NP-40, 1% DOC, 10mM Tris-HCl ph 8, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 10 mM butirat sòdic i 100 µM ortovanadat) i 2 rentats amb tampó Tris-EDTA (TE).

- *De-crosslinking* i Elució: La purificació de les proteïnes unides al DNA immunoprecipitades es fa segons les instruccions del IPure kit (Diagenode). Les mostres es guarden a -20ºC per al seu subseqüent anàlisis per PCR a temps real (*Real Time* PCR, RT-PCR).

Els *primers* utilitzats en l'anàlisi del ChIP apareixen en la **Taula 6** i van ser dissenyats segons el ChIP-seq de p27 i PCAF.

Taula 6. *Primers* utilitzats en la RT-PCR dels experiments de ChIP.

ChIP-seq	*Primers* ChIP	Seqüència (5'-3')
p27-PCAF	Control1 FW	AAATTCCACTGTGGCACCTC
p27-PCAF	Control1 REV	CTCTCAGGACCTGCCAGAAC
p27	GRIN3A FW	GCCAAGCAGTGAGAACAACA
p27	GRIN3A REV	GATCCTCACATCACTCCTCTCC
p27	RERGL FW	ATTGGAATCAGTGCCCTTGT
p27	RERGL REV	TGGCTTGTAGAAAGCCACCT
p27	UNC5D FW	GAGAGAGGGCTGGAAATGAA
p27	UNC5D REV	ATATCCCACGGAAAATGCAA
PCAF	GRIN3A FW	CGAACTAGGGGAGGAGAAGG
PCAF	GRIN3A REV	GGCTGCTACCCTACAACCTG
PCAF	UNC5D FW	AGTGTGATGCCTCCAGCTTT
PCAF	UNC5D REV	AGCCATACTTCCCAAAGCAA
PCAF	ROBO1 FW	CCCTGCAGGTTTGGAACTAC
PCAF	ROBO1 REV	CTTCCTGTGCTCATCAGTGC
PCAF	SPAG9 FW	GTTGCCTCCAGACTGCTTTC
PCAF	SPAG9 REV	CACAGTTGTGGGGACTAGCA

6. Anàlisi d'expressió

6.1. Extracció RNA

Es recullen els pel·lets de cèl·lules transfectades, produïdes tal com s'ha explicat en l'apartat 2.5 i 2.6, es resuspenen en 200µl de PBS i utilitzant sempre puntes de filtre es duu a terme l'extracció segons les instruccions del High Pure RNA Isolation kit (Roche). Breument, després de la lisis cel·lular, el RNA s'uneix al filtre del kit. El DNA contaminant és eliminat mitjançant una digestió de 15 min a RT. Els filtres es netegen varies vegades i el RNA resultant s'elueix en 50µl d'H_2O. La concentració del RNA aïllat es quantifica amb l'espectrofotòmetre Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

6.2. Retrotranscripció

Per tal d'utilitzar el RNA per l'anàlisi de RT-PCR, 'retrotranscribim' 1µg de RNA de cada mostra en cDNA utilitzant el High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) segons el protocol del kit.

6.3. RT-PCR

Hem utilitzat la PCR a temps real per a dos objectius. Primer de tot, per a detectar els nivells d'expressió dels gens d'interès (la **Taula 7** mostra la llista de *primers* utilitzats per mRNA i pre-mRNA) a partir del cDNA obtingut segons els apartats 6.1 i 6.2. En segon lloc, per a analitzar els experiments de ChIP. Quan s'ha eluït el DNA de la nostra proteïna la RT-PCR ens permet identificar les seqüències d'interès (**Taula 6**).

En tot dos casos el protocol de RT-PCR utilitzada és la mateixa. Hem utilitzat Express SYBER GreenER qPCR Supermix (Invitrogen) seguint les instruccions del fabricant. Resumint, es prepara 0.3µM *primer* (*forward* i *reverse*), 1 µl cDNA o DNA (experiments de ChIP) i Supermix 2X per a cada pou d'una placa de polipropilé de 96 pous (Agilent Biosystems), fent duplicats per cada mostra. La placa es col·loca en el termociclador Mx3005P (Stratagene) o AB7500 (Applied Biosystems) i es programen els següents passos: 1) 5min a 95ºC, 2) 15sec a 95ºC, 3) 60sec a 60ºC (les lectures s'agafen en aquest pas), 4) repetició des de pas 2, 35 cops, 5) 1 min a 95ºC, 6) Disminució gradual de la temperatura fins a 55ºC amb lectures constants (lectura de la corba de dissociació), 7) a 4ºC *forever*.

Taula 7. *Primers* utilitzats en la RT-PCR dels experiments d'expressió de mRNA i de pre-mRNA. Els dissenyats per Sigma (KiCqStart™) tenen la nomenclatura FH1 o RH1, la resta van ser dissenyats en aquesta Tesi.

Primers mRNA	Seqüència (5'-3')
p27 FW	ATGTCAAACGTGCGAGTGTC
p27 REV	TCTCTGCAGTGCTTCTCCAA
PCAF FW	TGGCTGGAAGAACCCTAACCCCTC
PCAF REV	AAGGGCATGGCTACAGCTTCGAC
GAPDH FW	ACCCAGAAGACTGTGGATGG
GAPDH REV	ACACATTGGGGTAGGAACA
FH1_ZNF716	AAACACCCAGTTACATGTTC
RH1_ZNF716	CTCACCTACACTTTTACAGC
FH1_GABRG2	TTTAGGTATCACCACTGTCC
RH1_GABRG2	GGTTGCTGACAAAATAATGC
FH1_GHR	CTCCTCAAGGAAGGAAAATTAG
RH1_GHR	GTGGAATTCGGGTTTATAGC
FH1_IGF1R	AAAGACAAAATCCCCATCAG
RH1_IGF1R	TGCAGGAAATTCTCAAAGAC
FH1_IL7	TCGATCAATTATTGGACAGC
RH1_IL7	AGGAAACACAAGTCATTCAG
FH1_ARHGEF7	AAGTTCACGCAAAGAATCTG
RH1_ARHGEF7	ATACGGTATCCACAAGACTC
FH1_SPAG9	AGACTTGGTGAGAGAAGAAG
RH1_SPAG9	CTTCACGTGTACAATACTGAG
FH1_RERGL	CCCTACATCCTTAAATAACTGC
RH1_RERGL	GGCTTTTGTAACAGAAACAG
FH1_GRIN3A	CAAGTTACATCATCCTTCCC
RH1_GRIN3A	CATCTCTGGGAAACTTTGTC
FH1_UNC5D	AAATTCCCTACTCCATCAGAC
RH1_UNC5D	TCCTGTTGATGCTGTTTTTC
FH1_GLI3	CTCCATTGCATATGACTTCC
RH1_GLI3	GCGGATATAGTCCATGTAGG
FH1_CRBN	CAGTTTATCCTTATGTGGGC
RH1_CRBN	GCCTTATACACAGTAAGTGTC
FH1_DGCR6	CAGCAGCGAGAACTAGAG
RH1_DGCR6	TTGGTGGTCACGTAGAAG
FH1_ROBO1	CCAGATATGAAATCCGAGATG
RH1_ROBO1	AACAGTCAGAGTAGCAGATG

Primers pre-mRNA	Seqüència (5'-3')
GRIN3A FW	GGCCCAATCGTTAAGCAATA
GRIN3A REV	GAGTTTCCACGGGAGAGTCA
IGF1R FW	AAGGGGAATTTCATCCCAAA
IGF1R REV	AGGAAAAGTTCCCGCAGTG
UNC5D FW	AGTGGGTCCATCAGAACGAG
UNC5D REV	GGGGGTGATTTCCAGTCTTT
SPAG9 FW	GCCATACATCACTTGCCACA
SPAG9 REV	TCATGGACTAACCACGAGCA
ZNF716 FW	TCCTGCAAGTATTCGCAGATT
ZNF716 REV	GTGACAGACCCAGCACTCAC
ROBO1 FW	CCCCTGAAATTGATCAGCAC
ROBO1 REV	TGTTTCTGGCCCAGCTTATT

6.4. Assaig luciferasa

Per tal de veure l'efecte de p27 i PCAF en la regulació de l'expressió de dos gens diana GRIN3A o ROBO1 es clonen les seqüències de DNA d'unió a p27 o PCAF en aquests gens en el vector pGL3-*promoter vector*. Les dades dels ChIP-seqs ens mostren que p27 s'uneix a ROBO1 en la regió chr3:79257543-79257776 i a GRIN3A en la regió chr9: 103520403-103520670, PCAF s'uneix a GRIN3A en la regió chr9: 103539425 -103539691.

En el cas dels experiments de silenciament, cèl·lules sh(-), shp27 o shPCAF són transfectades amb Lipofectamine 2000. Es transfecta el vector control (pGL3Ø) o el vector amb les seqüències clonades i el vector CMV, que conté el gen de la β-galactosidasa. En el cas de la sobrexpressió, les cèl·lules es transfecten amb el vector d'expressió de p27 o PCAF, el pGL3 pertinent i el CMV. S'utilitzen plaques de 24 pous i sempre es fan triplicats per a cada condició. A les 24 hores de transfecció les cèl·lules es renten amb PBS i s'afegeix 150µl de Reporter Lysis buffer (Promega) seguint les instruccions del fabricant. Resumidament, es manté la placa amb tampó de lisi durant com a mínim 30 minuts a -80ºC, passat aquest temps, es descongelen en gel, es recullen les mostres i es centrifuguen a 13.000rpm durant 10 min a 4ºC, el sobrenedant es passa a un tub nou.

L'activitat luciferasa es mesura amb el Luciferase Assay System (Promega) utilitzant 10µl per cada mostra i fent duplicats. La lectura es duu a terme amb el luminómetre GLOMAX 96m (Promega) utilitzant 50 µl de luciferase assay reagent, la lectura de cada pou es fa en 2 segons, amb 10 segons de pausa entre pou i pou.

Per a mesurar l'activitat de la β-galactosidasa, que ens donarà l'eficiència de la transfecció en cada mostra, utilitzarem 20µl de mostra i 50µl de reactiu de la β-galactosidasa (0.6 M Na_2HPO_4-$7H_2O$, 0.4 M NaH_2PO_4-H_2O, 0.1 M KCl, 0.01 M $MgSO_4$-$7H_2O$ pH 7, i 4mg/ml ONPG (Sigma)). Esperem uns 5min fins que el color groc és fa visible i es llegeix l'absorbància, Ab=600nm, amb el lector de plaques Synergy 2 (Biotek).

La ràtio de l'activitat luciferasa i l'activitat β-galactosidasa ens indica l'expressió relativa de cada vector per cada condició.

7. Tècniques High-throughput

7.1. Microarray d'expressió

Amb l'objectiu de determinar quins gens estan *up/down*-regulats per efecte de PCAF, es va fer un *array* d'expressió comparant l'expressió gènica de cèl·lules control i cèl·lules shPCAF.
A partir de dos cultius cel·lulars control i dos cultius shPCAF generats independentment, es va extreure el RNA, utilitzant el RNeasy mini kit de Qiagen. Es va seguir estrictament el protocol indicat per la casa comercial. Tot el material utilitzat va ser doblement autoclavat. El protocol d'extracció de RNA es va desenvolupar en una campana de flux, únicament utilitzada per treballar amb RNA.

Un cop obtingudes les mostres de RNA, es va determinar la seva concentració amb l'espectrofotòmetre Nanodrop ND-1000 (Thermal Scientific), i es va validar la seva qualitat (integritat, 28S/18S i concentració) per a ser utilitzades en un micorarray, amb el bioanalitzador Agilent 2100.

A partir d'aquestes mostres, es va realitzar el microarray d'expressió, utilitzant el suport Exon Gene, d'Affymetrix, en la Plataforma genòmica del CEK (Centre Esther Koplovich), tot seguint les pautes del fabricant.

Les dades crues obtingudes amb el software Expression Console d'Affimetrix es van poder analitzar i comparar entre elles amb DNA-Chip Analyzer (dChip). Es van considerar com a significativament regulats aquells gens que en el shPCAF presentaven respecte el control un *fold-change* $\leq$-0.07 o $\geq$0.07 i tenien un *p-valor*$\leq$0.05.

Per a l'anàlisi d'ontologia gènica s'ha utilitzat l'eina informàtica DAVID, com es descriu en l'apartat anàlisi d'agrupació funcional (pàg. 56).

7.2. Seqüenciació de la Immunoprecipitació de cromatina (ChIP-seq)

Experiments de ChIP de p27 en cèl·lules HCT116 o MEF sincronitzades (en G0) i de PCAF en cèl·lules asincròniques HCT116 o MEF es van dur a terme segons s'ha descrit anteriorment. En la **Figura 9** es pot veure una representació de la tècnica. Un cop s'ha aïllat el DNA, les mostres de ChIP junt amb la mostra control (input) són seqüenciades.

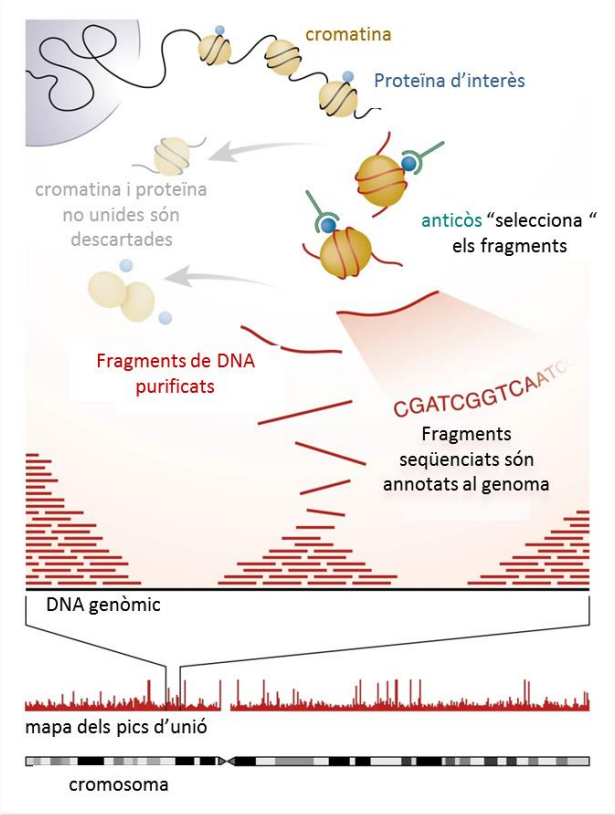


Figura 9. Representació de la tècnica del ChIP-seq. Adaptació de Botcheva, McCorkle, McCombie, Dunn, & Anderson, 2011.

- Preparació de la llibreria del ChIP-seq i la seqüenciació Ilumina: Les llibreries s'han preparat amb NEBNext®ChIP-Seq Library Prep Reagent Set del kit d' Ilumina®(ref. E6200S) segons les instruccions de la casa comercial. Resumint, 10ng del DNA enriquit dels inputs o dels ChIPs són sotmesos a *end repair*, s'afegeixen bases 'A' a les terminacions 3' dels fragments de DNA on s'hi lliguen els adaptadors. Totes les purificacions s'han dut a terme amb les columnes de PCR de Qiagen (refs. 50928106 i 50928006). La selecció de la mida de la llibreria s'ha fet en gels d'agarosa al 2%. S'ha amplificat la llibreria dels fragments de la mida seleccionada per PCR. Les llibreries resultants són analitzades amb el chip Agilent DNA 1000, per tal d'estimar la quantitat i confirmar les mides. Després, són quantificades per qPCR (PCR quantitativa) utilitzant la KAPA Library Quantification Kit (ref. KK4835, KapaBiosystems). Finalment, la seqüenciació es fa en HiSeq2000, 1 lectura, 50 nucleòtids (nts) (**Taula 8**).

- Anàlisi i visualització de les dades del ChIP-seq: l'anàlisi amb l'Ilumina *pipeline* alinea les lectures (*short reads*), permetent com a màxim 2 diferències (*mismacth*), amb el genoma de referència del UCSC (The Genome Sequencing Consortium) per ratolí (mm9) o per humà (hg18), utilitzant el programa BOWTIE (Langmead et al. 2009).
  Per a definir els pics enriquits s'ha utilitzat l'algoritme MACS (versió 1.4) amb els següents paràmetres: --nº model, --tsize=46, --bw=300 (Zhang et al. 2008). Posteriorment, s'han analitzat amb el mètode de correlació Pyicos (Althammer et al. 2011).
  L'anotació dels pics enriquits al seu gen EnsEMBL (Hubbard et al. 2007) més proper es duu a terme amb el Bioconductor package ChIPpeakAnno (Zhu et al. 2010).
  La distribució de les lectures enriquides al llarg del genoma i dels inicis de transcripció (TSS, Transcription start site) dels *Refseq* gens s'ha determinat amb el CEAS (Shin et al. 2009). Els gràfics dels perfils de densitat dels pics al voltant del TSS (Transcription Start Site) o TTS (Transcription Termination Site) estan basats en el *sitepro* de l'eina CEAS.

Taula 8. Alineament de la seqüenciació d'Ilumina. Hi representem l'estadística de la seqüenciació realitzada (HiSeq Sequencing Kit Trueseq v3) i el seu posterior alineament (amb la versió hg19 d' *Homo sapiens* de referència) dut a terme mitjançant l'algoritme de mapatge GEM (permetent com a molt 2 *mismatch*). Lectures total considerades: 10% del total de lectures seqüenciades a l'atzar. Lectures úniques: lectures total que s'alineen a una única localització de la referència. U0: nombre de lectures úniques amb 0 *mismatches*. U1: nombre de lectures úniques amb 1 *mismatches*. U2: nombre de lectures úniques amb 2 *mismatches*. R012: nombre de lectures alineades a múltiples localitzacions de la referència amb 0, 1 o 2 *mismatches*. NM: nombre de lectures sense cap alineació amb la referència.

	HCT Asincro Input-seq		**HCT PCAF ChIp-seq**	
	Lectures	%	Lectures	%
Lectures totals considerades	2396387	100,00	2472256	100
Lectures úniques	1984797	82,80	2026651	82,00
U0	1820473	76,00	1845732	74,70
U1	141324	5,90	155657	6,30
U2	23000	1,00	25262	1,00
R012	291318	12,00	303872	12,30
NM	102778	4,30	123763	5,00

	HCT G0 Input-seq		**HCT p27 ChIp-seq**	
	Lectures	%	Lectures	%
Lectures totals considerades	2611036	100,00	2494872	100
Lectures úniques	2028944	77,70	2043054	81,90
U0	1847265	70,70	1866710	74,80
U1	156797	6,00	151161	6,10
U2	24882	1,00	25183	1,00
R012	324196	12,40	304512	12,20
NM	233739	9,00	128533	5,20

- **Motius *De novo***

Per a definir les seqüencies curtes més representades dels pics enriquits del ChIP-seq, utilitzem seqüències de com a màxim 100 nucleòtids (50 nt abans i 50nt després del pic *summit*). Els 1000 pics més enriquits (basant-nos en el *fold-change*) són utilitzats per a descobrir els motius amb el programes MEME (Bailey & Elkan 1994) i el WEEDER (Pavesi et al. 2004).

- **Anàlisi d'agrupació funcional**

L'anotació funcional dels gens diana es basa en l'ontologia gènica (GO) ((Ashburner et al. 2000) Consortium, 2000; http://www.geneontology.org) extreta del EnsEMBL (Hubbard et al. 2007) i de la base de dades de les vies de KEGG (Kanehisa et al. 2008).

D'acord amb això, tot els gens es classifiquen en les categories GO dels processos biològics (GOBP) i les vies quan és possible.

Utilitzem dues eines per al anàlisi de GO: el Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) Bioinformatics Resources 6.7. Un recurs on-line que engloba extenses i heterogènies bases de dades públiques ((Huang et al. 2009a; Huang et al. 2009b); http://david.abcc.ncifcrf.gov/). S'han utilitzat els ajustaments per defecte del DAVID 6.7 per a la selecció de les següents categories d'ontologia de gens (GO): Gene Ontology (GOTerm_BP_FAT) i Patways (KEGG_PATHWAY). En les gràfiques es representen els grups del GO o Patways específicament enriquits dins d'una categoria funcional segons el valor d'enriquiment relatiu calculat pel DAVID, que depèn del *fold enrichment* (enriquiment d'un terme de GO sobre el background genòmic), el nombre de gens agrupats pel DAVID dins d'una mateixa categoria de GO i el p-valor (el valor estandard de tall del DAVID és 0.1 (p-valor<0.1 implica enriquiment específic; com més petit sigui el p-valor, més gran serà l'enriquiment))

En segon lloc, utilitzem l'eina Gitools per a l'anàlisi d'enriquiment, la comparació dels resultats dels diferents ChIP-seqs i per la generació dels *heatmaps* ((Perez-Llamas & Lopez-Bigas 2011); www.gitools.org).

Els p-valors s'ajusten per a ser utilitzats pel mètode de test múltiples Benjamin i Hochberg de *False Discovery Rate* (FDR) (Benjamini & Hochberg 1995).

- **Anàlisi dels Factors de Transcripció**

Per a l'anàlisi dels possibles motius de factors de transcripció (TF) que es troben en les regions dels pics significatius (150nt al voltant del pic *summit*), utilitzem l'algoritme STORM (Schones et al. 2007) amb un p-valor de tall basat en la mida de la seqüència *input* (1/100 per seqüència-mida) i utilitzant unes *Position Frequency Matrix* (PFM) de la base de dades Transfac (versió professional 2009.4).

- **Co-ocurrència i enriquiment dels Factors de Transcripció al voltant dels pics enriquits**

La possibilitat de trobar un motiu de TF en la regió d'un pic significatiu (150np al voltant del pic *summit*) i la sobrerepresentació d'aquest TF, s'ha analitzat amb l'eina Pscan, utilitzant els següents paràmetres: *mixed background*, hg18 i matriu TRANSFAC.

Pscan avalua l'enriquiment local, comparant la mitja del t-test i la desviació estàndard del valor dels oligos que millor s'alineen en les regions del inputs amb la mitja i la desviació estàndard del millor alineament de les regions genòmiques flanquejant al input.

L'enriquiment local permet identificar els motius amb preferència per unir-se en aquestes regions. El p-valor de l'enriquiment local (LPV) indica si el motiu es troba enriquit o no en una determinada regió input de 150bp respecte les regions genòmiques flanquejant.

- **Anàlisi de solapament de pics**

La superposició dels pics del ChIP-seq de p27 i el ChIP-seq de PCAF es va dur a terme amb el BedTools (Quinlan & Hall 2010) i la significança del solapament va ser analitzada pel Hypergeometric test. Tot i que, per a generar els diagrames de Venn i l'anàlisi del solapament dels gens diana es va utilitzar un programa en llenguatge R personal. La significança del solapament es va calcular amb un test khi-quadrat. El solapament de pics es considera quan es dóna una superposició entre pics d'almenys una bp.

RESULTATS

p27 i PCAF, estabilitat i interacció

En aquest apartat ens centrarem en comprovar la interacció entre p27 i PCAF i en definir-ne la seva funció, diversos resultats formen part de la publicació presentada al final d'aquesta Tesi (Pérez-Luna et al. 2012).

1. PCAF regula l'estabilitat de la proteïna p27 mitjançant la seva acetilació en la lisina 100

- p27 i PCAF co-localitzen al nucli

En el nostre laboratori s'ha descrit la interacció de l'acetiltransferasa PCAF amb el domini aa91-120 de p27 (Pérez-Luna et al. 2012). Per determinar la localització subcel·lular d'aquesta interacció es va fer la detecció immunocitoquímica d'ambdues proteïnes. Els resultats ens van mostrar que aquestes proteïnes efectivament co-localitzen i ho fan al nucli. En la **Figura 10** mostrem unes imatges representatives de dos models cel·lulars, obtingudes amb microscopi de fluorescència confocal (SP5) al co-transfectar les construccions de la proteïna PCAF fusionada a la *Yellow Fluorescent Protein* (YFP) i p27 fusionada a la *Cyan Fluorescent Protein* (CFP).

Aquest resultat junt amb els experiments previs de cromatografia d'afinitat i immunoprecipitació fets al laboratori revelen que p27 interacciona amb PCAF en els diversos models cel·lulars estudiats. Aquesta interacció és directe entre ambdues proteïnes i es produeix en el domini aa91-120aa de p27 que anomenem PID (*PCAF-Interacting Domain*).

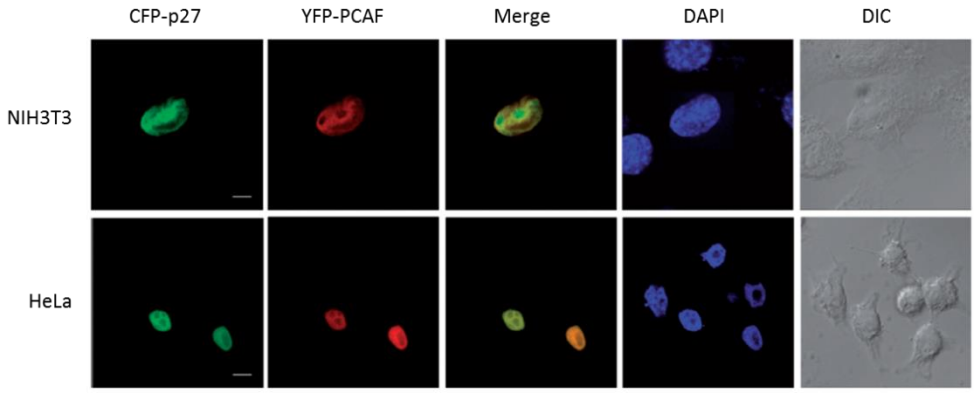


Figura 10. PCAF i p27 colocalitzen al nucli en diversos models cel·lulars. Cèl·lules murines NIH3T3 i humanes HeLa van ser co-transfectades amb YFP-PCAF i CFP-p27 i a continuació es van tenyir amb DAPI per a la seva subseqüent visualització amb microscopia confocal. Escala: 5 µm.

- **p27 és acetilada en la K100 *in vivo***

Com que p27 és un substrat acetilable per PCAF *in vitro* vam voler determinar en primer lloc si aquesta acetilació es donava *in vivo*. Per fer-ho vam transfectar la p27 normal (*wt, wildtype*) i com a control negatiu es va utilitzar la proteïna p27 K13R, en la que s'havien mutat totes les lisines de la proteïna (un total de 13) a arginines i que, per tant, no és acetilable.

Paral·lelament també volíem determinar quina de les 8 lisines acetilables per PCAF en assajos *in vitro,* emprant pèptids de p27 (Pérez-Luna et al. 2012), eren acetilades *in vivo*. Per assolir aquest objectiu es van construir variants de p27 que contenien canvis de lisines a arginines en diferents posicions. Concretament, vam preparar el mutant p27 K3R que té mutades les lisines K25, K96 i K100, el p27 K5R, que té mutades les 5 lisines restants i la p27 K100R que només té mutada a arginina la lisina en posició 100.

Després de co-transfectar la p27 wt o els mutants amb PCAF, immunoprecipitem p27 (**Figura 11**) i en determinem el seu estat d'acetilació per WB emprant anticossos anti-lisines acetilades. Podem veure que només s'acetila la p27 wt i la p27K5R, no ho fan en canvi la p27K3R i p27 K100R, fet que determina que la lisina K100 de p27 és el lloc específic d'acetilació per PCAF a les cèl·lules.

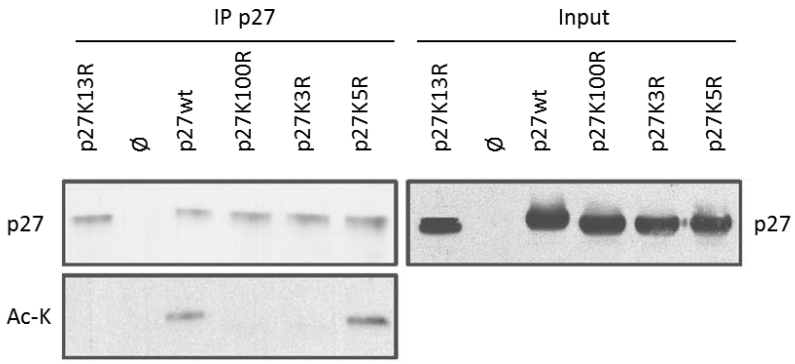


Figura 11. PCAF acetila la lisina 100 de p27 *in vivo*. Cèl·lules HEK293T són co-transfectades amb YFP-Flag-PCAF i p27 wt o p27K13R o p27K100R o p27K3R o p27K5R o vector buit (Ø), els lisats cel·lulars són immunoprecipitats amb anti-p27 i posteriorment els nivells de p27 totals o p27 acetilada són analitzats per WB amb anti-p27 o anti-acetil-lisina (Ac-K). (panell esquerre). Els nivells d'expressió dels diversos contructes de p27 són determinats per WB anti-p27 (panell dret).

- **L'acetilació en la K100 regula l'estabilitat de p27**

Anteriorment en el nostre laboratori s'havia observat que al sobrexpressar PCAF els nivells de proteïna de p27 es veien disminuïts. En canvi, aquesta disminució no es veia si es transfectava una PCAF a la que li mancava el seu domini catalític. Per altra banda, en les cèl·lules tractades amb shPCAF, veiem que a nivell de proteïna, p27 es troba augmentada (**Figura 36**). Per tant, tot apuntava a que PCAF podia estar afectant l'estabilitat de la proteïna.

Per aquesta raó vam voler estudiar l'estabilitat dels mutants p27K100R i del p27Δ91-120 (domini d'unió a PCAF). Vam transfectar cèl·lules murines NIH3T3 amb la proteïna wt o els mutants i les vam portar a la quiescència mantenint-les durant 24h amb medi sense sèrum (G0). Posteriorment es van tornar a sembrar de nou amb medi de cultiu amb 10% de sèrum provocant-ne l'entrada al cicle i es van recollir a les 12h (G1). Les cèl·lules en G0 i en G1 es van fixar per analitzar-ne per una banda la seva localització subcel·lular mitjançant la tècnica d' immunocitoquímica, i per altra banda es van recollir pel·lets per al seu anàlisis per WB.

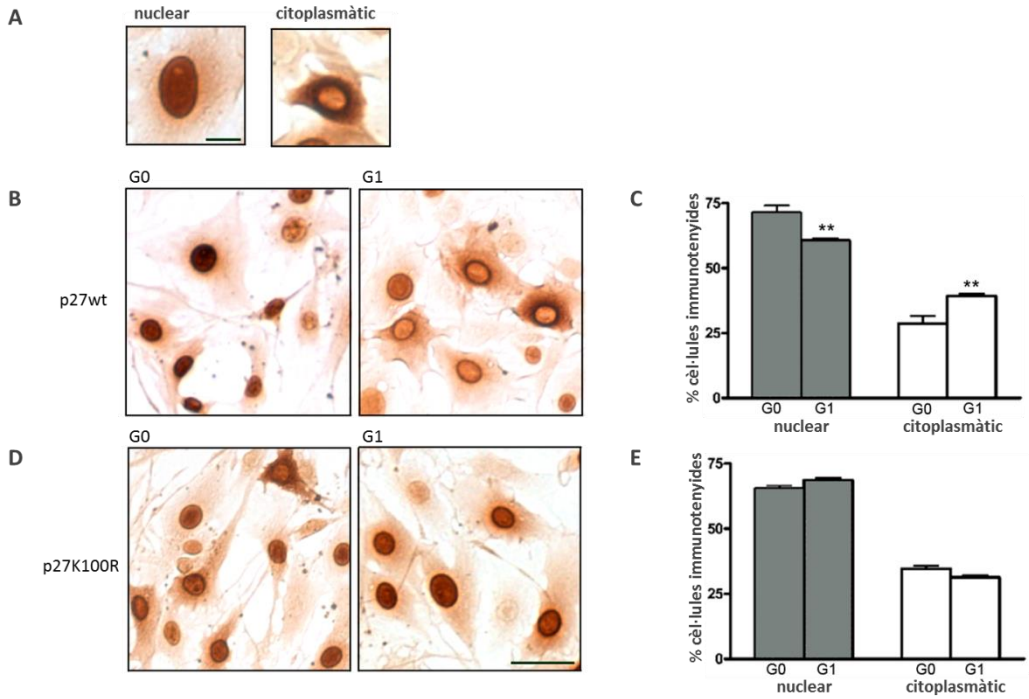


Figura 12. **p27K100R és retinguda al nucli en G1. (A)** Criteris utilitzats per a determinar la localització de p27, marcatge nuclear o citoplasmàtic.(**B/D)** Cèl·lules NIH3T3 són transfectades amb p27wt o p27K100R, deprivades 24h(G0), i es recullen per a marcar-les amb anti-GFP o es tornen a sembrar i es suplementen amb medi al 10% sèrum durant 12h (G1) i es recullen per al marcatge. (**C/E)** Representació del comptatge de 300 cèl·lules aprox. per experiment, en 4 experiments independents. Mitjana ± SD (desviació estàndard) Anàlisi estadístic t-student, **p=0,01.

En la **Figura 12** es mostren imatges representatives de cèl·lules tractades amb anti-p27. En la **Figura 12A** podem veure els criteris que hem utilitzat per a definir si la localització del marcatge de p27 és nuclear o citoplasmàtic.

Segons aquests criteris hem determinat la localització citoplasmàtica de p27 en unes 300 cèl·lules de 3 cobreobjectes diferents per cada condició en 4 experiments independents. En la **Figura 12B/D** és mostren unes imatges representatives de l'experiment. En la **Figura 12C/E** podem veure l'anàlisi estadístic de l'experiment, segons el qual podem determinar que el mutant p27K100R presenta una major predisposició a mantenir-se en el nucli en cèl·lules en G1. La p27wt es transloca de forma normal del nucli al citoplasma quan permetem a les cèl·lules proliferar. Pel contrari, el mutant p27K100R no és capaç de translocar-se. La degradació de p27 es dóna majoritàriament en el citoplasma, per la qual cosa, el fet que aquest mutant no pugui translocar-se al citoplasma significa que no es pot degradar via proteasoma i que sigui per tant, més estable.

A nivell proteic veiem que, efectivament, el mutant p27K100R s'acumula en G1 (**Figura 13A**). El mateix passa amb el mutant que té delecionat el domini d'unió amb PCAF (**Figura 13B**).

Podem concloure que l'acetilació provocada per PCAF en la lisina 100 de p27 impedeix la seva sortida del nucli al citoplasma, fet que impedeix la seva degradació citoplasmàtica i per això aquests mutants s'acumulen al nucli.

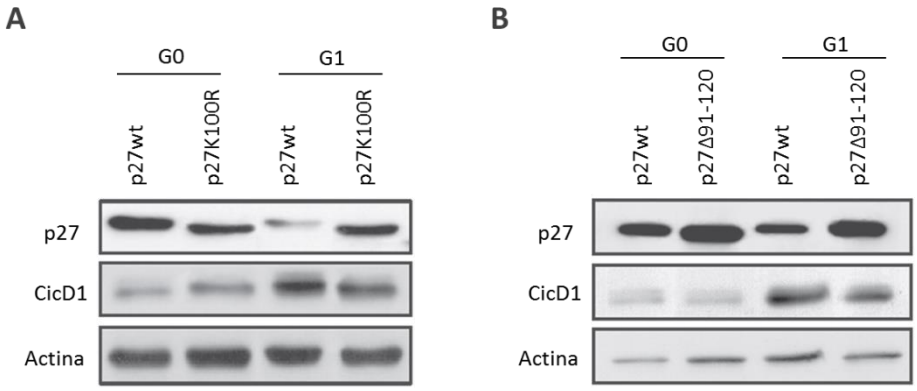


Figura 13. L'acetilació de p27 regula la seva estabilitat. (A) Cèl·lules NIH3T3 són transfectades amb p27wt o p27K100R, deprivades 24h (GO) i posteriorment suplementades amb 10% de sèrum durant 12h (G1). Les mostres cel·lulars es recullen a temps G0 i G1 . Els nivells de p27 d'ambdues formes de p27 són detectades per WB amb anti-GFP. El WB anti-CiclinaD1 s'utilitza per a monitoritzar la progressió del cicle cel·lular, i l'anti-actina, com a control de càrrega. (**B**) El mateix que en A però amb el mutant de p27Δ91-120.

2. PCAF interacciona amb p27 acetilada durant la fase G1 del cicle cel·lular

- L'acetilació de p27 durant el cicle cel·lular

p27, com a inhibidor de les ciclines-CDKs que és, presenta una cinètica acoblada al progrés del cicle cel·lular. És per això, que un cop sabem on i com PCAF acetila p27, vam voler monitoritzar la seva acetilació al llarg del cicle. Per veure si això ens donava pistes sobre la funcionalitat de l'acetilació de p27.

Per assolir aquest objectiu vam sincronitzar cèl·lules HeLa, portant-les a la quiescència, suprimint el sèrum del medi de cultiu durant 72 hores. Aleshores es van tornar a sembrar les cèl·lules amb medi suplementat amb sèrum al 10%, i es va recollir la mostra a temps 0 hores. A partir d'aquí es van anar recollint els extractes cel·lulars cada 2 hores fins a les 10-12 hores, que és quan aquestes cèl·lules entren en la fase S del cicle cel·lular segons resultats previs obtinguts al laboratori.

En la **Figura 14A**, podem veure com la p27 es comença ja a degradar cap a les 2 hores, un cop les cèl·lules reben estímuls mitogènics i progressivament entren en el cicle cel·lular. A les 10h ja ha desaparegut per complet. Mentre que per contra, la ciclinaD1, apareix cap a les 4-6 hores, preparant les cèl·lules per a la fase S.

Vam immunoprecipitar p27 per determinar-ne el grau d'acetilació al llarg del cicle (**Figura 14B**). Podem concloure amb aquests experiments que p27 es troba acetilada al llarg de tota la fase G1. Tenint en compte que la proteïna total es va degradant (**Figura 14A**), aquí veiem que mentre s'està degradant, p27 es troba acetilada. Aquesta acetilació presenta un pic a les 2 hores, previ al punt màxim de degradació de p27 que s'observa a les 4-6 hores. Justament a les 4-6 hores sembla que p27 perdria la senyal de acetilació, per posteriorment recuperar-ne els nivells, que semblen ser els basals.

Per altra banda, trobem que PCAF co-immunoprecipita al llarg del cicle amb la p27 endògena (**Figura 14C**).

Globalment, aquesta cinètica d'acetilació sembla coincidir amb la cinètica de translocació nucli-citoplasma, i subseqüent degradació de la p27. Fet que ens acosta encara més a afirmar que PCAF té un paper important en la degradació de p27 mitjançant la seva acetilació.

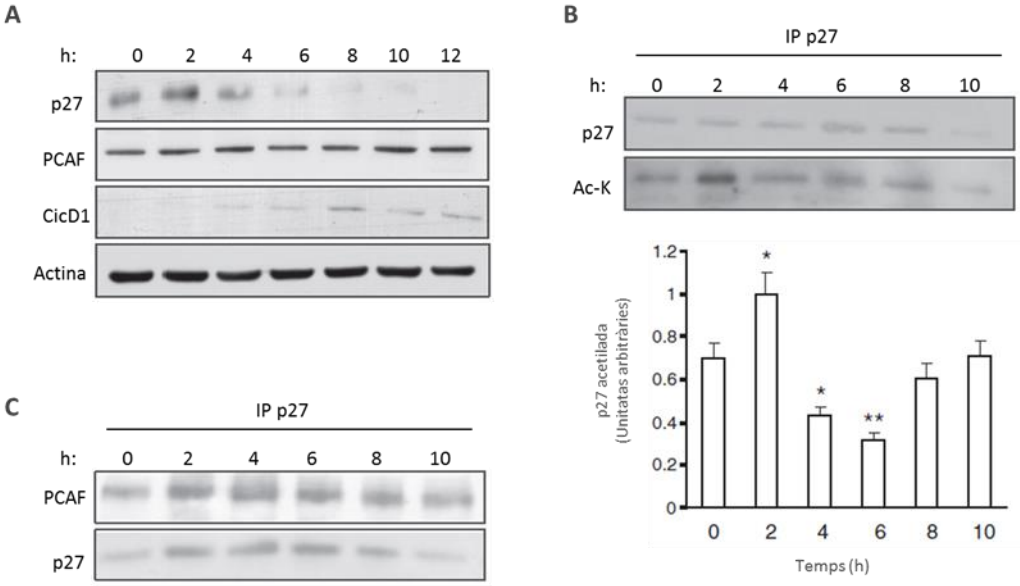


Figura 14. **L'acetilació de p27 en el cicle cel·lular.** Cèl·lules HeLa són portades a la quiescència al mantenir-les sense sèrum durant 72h. Després són replantades en presència de sèrum (FBS) al 10% durant 10-12hores. Els extractes cel·lulars són recollits en el temps 0 (al replantar) i cada dues hores i són preparats per WB o IP. **(A)** Imatge representativa del WB de 4 experiments independents. L'anti-p27 mostra la seva degradació a partir de les 2 hores, PCAF ens mostra que la proteïna es manté estable, la ciclinaD1 l'utilitzem per monitoritzar el cicle cel·lular i l'actina com a control de càrrega. **(B)** Imatge representativa de 3 experiments independents del WB anti-p27 i la seva anti-Acetil-lisina posterior a la IP anti-p27. En el gràfic s'han representat les mitjanes ± SD de les quantificacions dels 3 experiments, utilitzant t-student's. *p<0.05, **p<0.001. **(C)** IP de p27 i posterior WB anti-PCAF i anti-p27.

- **PCAF i p27 interaccionen durant el cicle cel·lular en diversos models cel·lulars**

Amb els resultats obtinguts en cèl·lules humanes HeLa volíem aprofundir en la interacció entre la PCAF i la p27 endògenes. Ja que fins aleshores, per a descriure el mecanisme de interacció i la seva funció, tan sols havíem utilitzat les proteïnes exògenes.

Vam voler monitoritzar aquesta interacció en diferents línies cel·lulars, tant humanes com murines, per tal de veure si es tracta d'una interacció conservada. Així doncs, vam decidir dur a terme immunoprecipitacions tant de PCAF com de p27 per observar-ne la interacció al llarg del cicle cel·lular. També vam estudiar la co-immunoprecipitació d'altres factors importants per al cicle cel·lular com la ciclina D1 i CDK4.

Sincronitzem les cèl·lules en G0 i després les suplementem amb sèrum, recollim les mostres cada 6 o 8 hores fins que arriben al final de la fase G1. Com cada tipus cel·lular assoleix les fases del cicle a una velocitat diferent, ens hem basat en informació del laboratori extreta d'experiments de sincronització i FACS (Fluorescence-activating cell sorting) duts a terme en les diferents línies cel·lulars utilitzades en aquesta Tesi per tal de recollir les mostres a les hores adequades.

Com a model murí vam utilitzar les cèl·lules MEFs (**Figura 15A**) i les NIH3T3 (Dades no mostrades). En ambdues línies cel·lulars quan immunoprecipitem (IP) PCAF veiem co-immunoprecipitació (co-IP) de p27 tant en G0 com durant tota la G1. Però en canvi al immunoprecipitar la p27 veiem que PCAF només co-IP a les 0 i 8 hores. Per tant, sembla que la interacció decreix a mesura que avança el cicle cel·lular. Aquesta interacció és tènue, fet que pot ser degut a dues raons. Primer, que tinguem poques molècules de PCAF unides a p27 i moltes més molècules de p27 per a cada molecula de PCAF o bé, que, com l'anticòs de p27 és més potent que l'anticòs de PCAF, per poques molècules que hi hagi de la proteïna unides a PCAF ja les veiem en el WB.

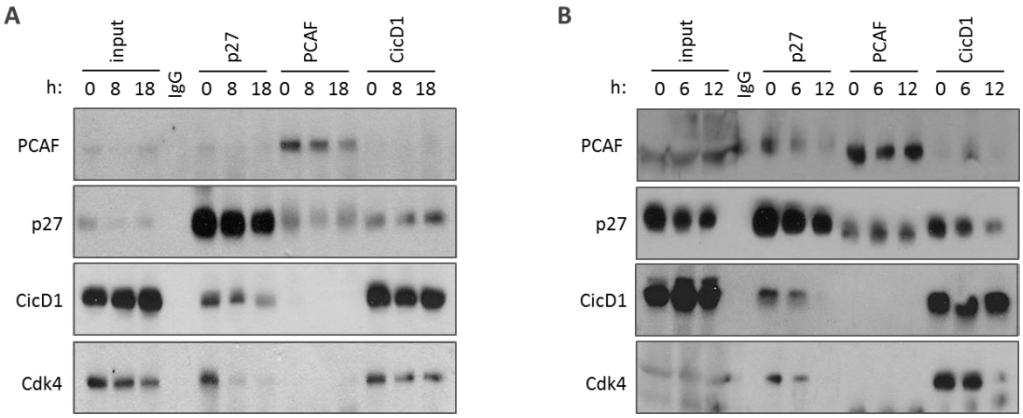


Figura 15. **PCAF endògena immunoprecipita amb p27 endògena en diferents models cel·lulars. (A)** Cèl·lules MEFs són sincronitzades en G0 mantenir-les sense sèrum durant 72h. Desprès són replantades en presència de sèrum (FBS) al 10% durant 18 hores (final G1/iniciS). Els extractes cel·lulars són recollits en el temps 0 i cada dues hores i són preparats per IP anti-p27, anti-PCAF i anti-ciclina D1 o inputs, com s'indica en la part superior de la figura. Posteriorment es va fer WB anti-PCAF, anti-p27, anti-CiclinaD1 i anti-Cdk4. **(B)** Cèl·lules HCT116 són sincronitzades en G0 mantenint-les 24 hores sense sèrum. És replanten i suplementen durant 12 hores, es van recollint cada 2 hores fins les 12h (final G1/S). Els extractes nuclears són preparats i sotmesos a IP i posteriorment a WB com en (A). Imatges representatives de 3 experiments independents.

Aquesta situació es repeteix quan fem l'experiment en cèl·lules humanes HCT116 (**Figura 15B**). En aquest cas tornem a veure que al immunoprecipitar PCAF la p27 co-immunoprecipita al llarg del cicle. En canvi, al immunoprecipitar p27 veiem que PCAF interacciona sobretot a les 0 i 6 hores.

Paral·lelament comprovem que p27 interacciona a G0 i al principi de la fase G1 amb ciclina D1 i CDK4. Per contra, veiem que PCAF no interacciona ni amb la ciclina D1, ni amb CDK4. Tampoc interacciona amb les ciclines D2 i D3 (Dades no mostrades).

3. Caracterització de PCAF en cèl·lules MEFs KO de p27

- PCAF es troba disminuïda en cèl·lules MEFs KO de p27

En el nostre laboratori utilitzem cèl·lules MEFs *(Mice Embryonic Fibroblasts)* KO (*knockout*) en p27 per a l'estudi mecanístic de p27. Al haver-la relacionat amb PCAF, el nostre primer objectiu va ser el de veure l'estat de PCAF en aquestes cèl·lules.

Al comprovar la proteïna en aquesta línia cel·lular vam observar que es trobava considerablement disminuïda respecte les MEF wt **(Figura 16)**. El fet que els nivells proteics estiguin disminuïts pot ser provocat per dos motius, degut a canvis en la transcripció o en la traducció de la proteïna.

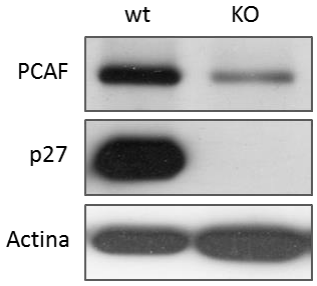


Figura 16. **PCAF es troba disminuïda en MEFs p27 KO.** Cèl·lules MEFs són processades per WB i tractades amb anti-PCAF, anti-Actina i anti-p27. Imatges representatives de 5 experiments independents.

Per tal de descobrir si és la traducció de PCAF, el mecanisme que es veu alterat en aquestes cèl·lules, es van tractar amb inhibidors del proteasoma: ALLNL i MG132 (**Figura 17A i 17B**). Al inhibir el proteasoma, la proteïna no es podrà degradar, per tant si tinguéssim disminució en la traducció en MEFs p27KO s'acumularia menys

proteïna que en MEF wt. Però aquest no és el cas, PCAF no s'acumula, ni en MEFwt ni en MEFs p27KO. Així doncs, la disminució de PCAF en els MEFs p27KO no es produeix per degradació via proteasoma.

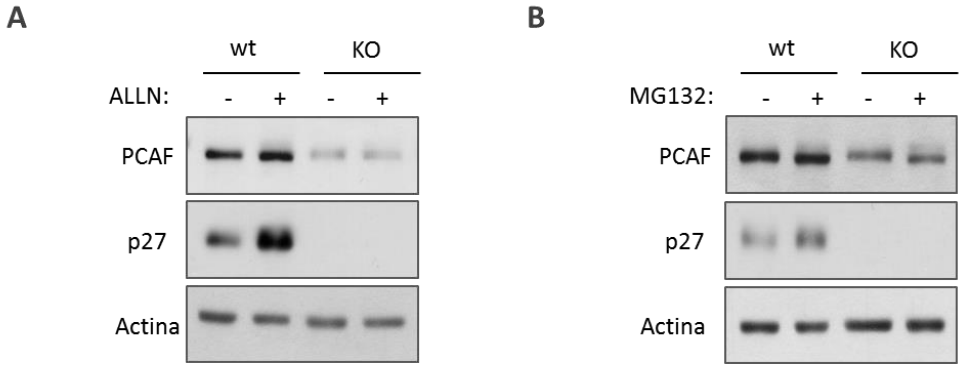


Figura 17. PCAF no es degrada per via proteasomàtica. (A) Cèl·lules MEFs són tractades amb inhibidors de proteasoma, ALLN durant 16 hores. Les mostres de les cèl·lules tractades o cèl·lules no tractades (control) són processades per WB on detectem amb anti-PCAF, anti-Actina i anti-p27 els nivells de proteïna total. Imatges representatives de 4 experiments independents. **(B)** Ídem de (A) però tractant les cèl·lules amb l'inhibidor de proteasoma MG132. Imatges representatives de 2 experiments independents.

Posteriorment, vam determinar la vida mitja de la proteïna, per veure si la PCAF en MEFs p27KO presenta una vida més curta, fet que explicaria la disminució que veiem a nivell proteic. En la **Figura 18** mostrem l'assaig de cicloheximida, un inhibidor de la síntesi proteica. Al suprimir la síntesi *de novo,* veurem la vida mitja de la proteïna que tenim en cada línia cel·lular. Però no veiem diferències, la vida mitja de la proteïna PCAF és d'unes 16 hores i no varia entre MEFs wt o MEFs p27KO.

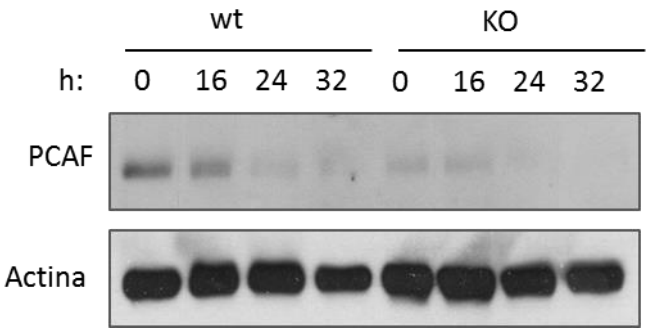


Figura 18. La vida mitjana de la PCAF en MEFs . Cèl·lules MEFs són tractades amb l'inhibidor de la síntesi proteica cicloheximida i recollides a diferents hores. Els nivells de PCAF són detectats per WB amb anti-PCAF i anti-Actina s'utilitza com a control de càrrega. Imatge representativa de 3 experiments independents.

Finalment comprovem els nivells de mRNA per determinar si és la transcripció de PCAF el que es veu afectat en MEF p27KO (**Figura 19**). Extraiem el RNA de les cèl·lules, sincronitzades en G0 i G1 i en cèl·lules asincròniques. Observem que el mRNA es troba dràsticament disminuït en MEFs p27 KO.

Aquest resultat pot ser interessant per tenir en compte en un futur si es treballa amb aquestes cèl·lules.

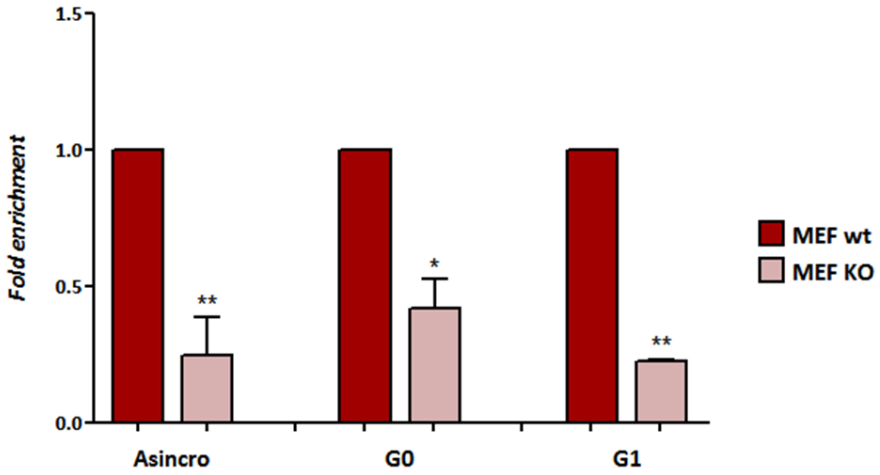


Figura 19. El mRNA de PCAF està disminuït en cèl·lules MEFs p27 KO. Extracció de RNA (Qiagen) de cèl·lules MEFs asincròniques o sincronitzades en GO o a final de G1 (mantenint-les sense sèrum durant 72 hores (G0) i després suplementant-les 18 hores (G1)). El mRNA s'ha retrotranscrit a cDNA (RT-Vilo, invitrogen) per a la seu posterior anàlisi de RT-PCR. Representació gràfica de les mitjanes ± SD de 4 experiments independents en cèl·lules asincròniques, i de 3 experiments independents en G0 i G1. Dades normalitzades a MEF wt.

p27 i PCAF col·laboren en la regulació transcripcional

PCAF és un conegut coactivador transcripcional que actua acetilant histones, factors de transcripció i altres proteïnes, fet que modifica l'estat de la cromatina, que passaria d'un estat silenciat (no acetilat i metilat) a un estat transcripcionalment actiu (Sterner & Berger 2000). PCAF es troba associada als complexes macromoleculars implicats en la transcripció gènica (Nagy & Tora 2007).

Per altra banda, com ja hem explicat en la introducció, el nostre grup i d'altres, han descrit el paper de regulador transcripcional de p27. p27 s'uneix a la cromatina i regularia la transcripció dels seus gens diana amb l'ajuda de p130/E2F4 (Pippa et al. 2012; Li et al. 2012)

Ara ens centrarem en la hipòtesi de que la proteïna PCAF podria tenir un paper rellevant en la regulació transcripcional duta a terme per p27. Definirem els gens diana comuns de p27 i PCAF per tal d'estudiar aquesta possibilitat.

1. ChIP-seq de p27 i de PCAF

Per tal d'assolir aquest objectiu vam voler definir els llocs d'unió a la cromatina de p27 i PCAF emprant la tècnica del ChIP-seq (*Chromatin Immunoprecipitation sequencing*) amb aquesta tècnica podem saber els llocs d'unió a la cromatina de la nostra proteïna d'interès a tot el genoma.

Les cèl·lules escollides per fer l'experiment van ser les MEFs i les HCT116, així tindrem els resultats en ratolí i en humà. L'elecció en concret d'aquestes línies és, en el cas de les MEFs, degut a l'existència en el nostre laboratori de dades de microarrays d'expressió en MEFs. En el cas de les HCT116, perquè en aquesta tesis es van dur a terme microarrays d'expressió en aquestes cèl·lules.

Vam fer ChIP anti-PCAF en cèl·lules asincròniques. En canvi, vam sincronitzar les cèl·lules en G0 abans de realitzar el ChIP anti-p27. En aquesta fase del cicle cel·lular p27 té una expressió màxima i duu a terme la seva funció principal de inhibidor de CDKs, després és degradada ràpidament. Per aquesta raó postulem que en G0 podrem definir millor el paper de p27 com a regulador de la transcripció.

Les mostres dels ChIPs van ser seqüenciades pel servei de la Unitat de Genòmica del CRG (Centre de Regulació Genòmica).

Les dades crues van ser analitzades pel bioinformàtic Dr. M. Khademul Islam, i posteriorment per nosaltres. D'aquesta forma hem obtingut, respecte la mostra control els fragments de DNA (representats gràficament per pics) enriquits amb la nostra proteïna (**Taula 8**). Com més enriquida estigui una seqüència, més vegades apareix en la mostra i això es tradueix en un pic més alt (i un fold-change també més gran) (**Figura 9)**.

En aquesta Tesi ens centrarem en les dades obtingudes en el ChIP-seq de p27 i PCAF en cèl·lules humanes HCT116.

En el ChIP-seq de p27 obtenim 1981 pics significatius, que corresponen a 1012 gens diferents. En el ChIP-seq de PCAF obtenim 10.878 pics significatius, que corresponen a 6.131 gens diferents. Observem doncs, que trobem diversos pics en un mateix gen.

- **Distribució dels pics significatius**

Primer de tot veiem la distribució dels pics d'unió a PCAF i a p27 en les diferents regions gèniques (promotors, exons, introns, 5' i 3' UTR, *downstream*, i distal intragèniques) en el genoma de cèl·lules HCT116 (**Figura 20**). La proteïna PCAF la trobem associada als promotors i al inici de la zona *downstream*, just després del gen, però sobretot en zones exòniques codificants dels gens. Aquest resultat coincideix amb el ChIP-seq en aquest cas dut a terme en cèl·lules primàries quiescents $CD4^+$ humanes, on PCAF es troba enriquida en els promotors, però també, a diferència de les altres HAT, p300 i CBP, es troba enriquida en el cos del gen, és a dir en les zones exòniques (Wang et al. 2009). Aquest enriquiment en el cos del gens concordaria també amb la funció de PCAF en l'elongació de la transcripció (Cho et al. 1998).

En la distribució dels pics en el ChIP-seq de p27 trobem només una zona molt enriquida, la zona distal intergènica. És a dir, p27 no presenta una tendència a unir-se ni als promotors, ni al cos del gen (exons i introns), ni al final dels gens. Sinó que s'uniria a zones més allunyades. Això no significa que no s'uneixi a les altres zones, només ens diu que en aquesta zona hi ha una concentració de pics més elevada respecte a la mostra control. Aquesta és la primera vegada que es fa un ChIP-seq de p27. No obstant, en el nostre laboratori, comptàvem amb les dades d'un ChIP-on-

chip, és a dir, teníem informació dels promotors on s'uneix p27. Amb aquesta nova informació sobre la distribució de p27 en la cromatina podem tenir una visió més global de la funció que té p27 en la regulació de la transcripció.

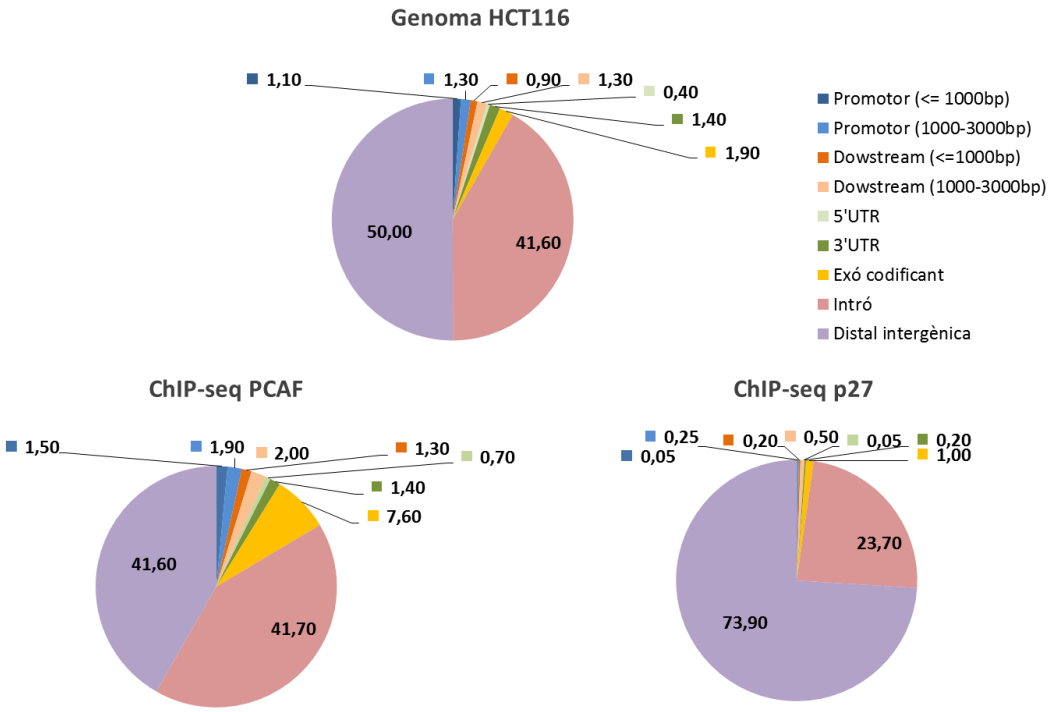
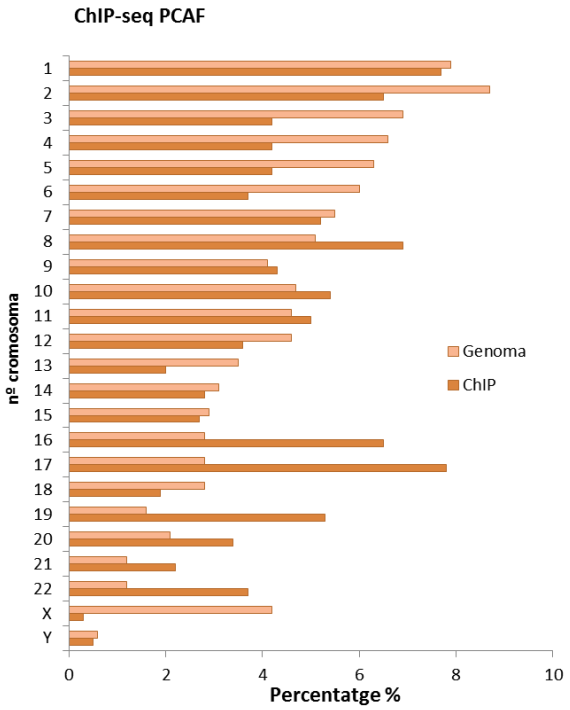


Figura 20. Distribució dels pics enriquits en el ChIP-seq de PCAF i de p27 en HCT116. Respecte la distribució de la mostra control del genoma de les cèl·lules HCT116 podem veure que en els pics del ChIP-seq de PCAF estan enriquits sobretot les zones exòniques. Els pics del ChIP-seq de p27 presenten una distribució majoritàriament intergènica distal.

En la **Figura 21** hem representat la distribució dels pics dels ChIP-seqs en els cromosomes. En el ChIP-seq de PCAF hi ha un cúmul significatiu de pics en els cromosomes: 8, 16, 17, 19, 20 i 22. Mentre que en el ChIP-seq de p27 trobem una acumulació de pics en els cromosomes: 8, 10, 16, 21 i curiosament en el Y (un cromosoma amb pocs gens dels quals pràcticament tots estan relacionats amb la determinació i desenvolupament del sexe masculí).



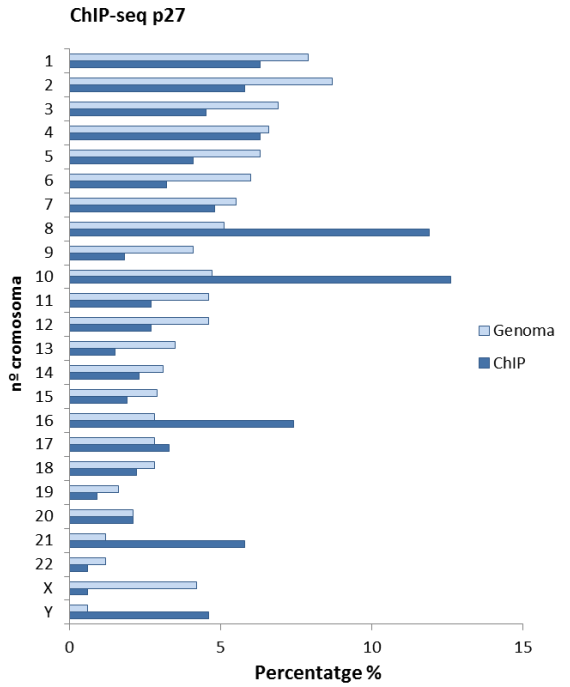


Figura 21. Distribució cromosòmica dels pics enriquits en el ChIP-seq de PCAF i de p27 en HCT116. Representació dels percentatge dels pics significatius del ChIP-seq en cada cromosoma. Segons aquests percentatges, PCAF es troba enriquida en el cromosoma 16, 17, 19, 20 i 22. p27 en canvi, es troba majoritàriament unida al cromosoma 8, 10, 16, 21 i Y.

També hem fet un estudi del perfil d'unió de p27 i PCAF al voltant dels llocs d'inici de la transcripció (TSS, *transcription start site*) i dels llocs de terminació de la transcripció (TTS, *transcripton termination site*) (**Figura 22**). El perfil d'unió als TSS de p27 disminueix dràsticament des de -500bp a 0 bp per desprès augmentar de cop de 0 bp a 1000 bp i tornar a normalitzar-se a mida que s'allunya del TSS (**Figura 22A**). En canvi, PCAF ja augmenta la unió més lentament des de -3000 bp a 0 bp, i també presenta un pic important d'unió de 0 bp a 1000 bp com en el perfil de p27. En els TTS tant p27 com PCAF presenten un pic negatiu a les 0 bp (**Figura 22B**).

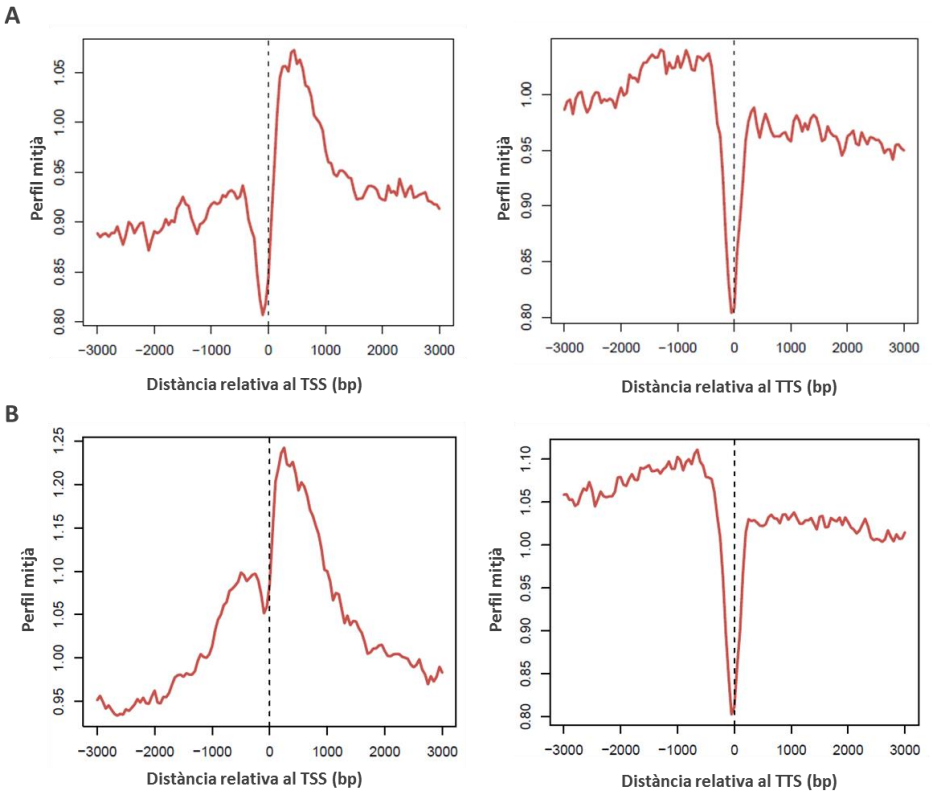


Figura 22. Perfil dels pics del ChIP-seq de PCAF i de p27 en HCT116. Representació del perfil mitjà dels pics trobats al voltat del lloc d'inici de la transcripció (TSS) i de terminació (TTS). **(A)** Pics del ChIP-seq de p27. **(B)** Pics del ChIP-seq de PCAF.

A banda de la distribució diguem-ne espacial dels pics, també n'analitzem el biotipus. El biotipus d'un gen es classifica segons sigui una proteïna codificant, un pseudogèn o un RNA no codificant. En la **Figura 23** hem representat aquesta classificació, una adaptació de la classificació descrita pel GENCODE. La distribució dels pics del ChIP-seq de PCAF segons el biotipus al qual pertanyen reflexa una distribució similar a la del genoma humà analitzat en la última versió del

GENCODE (versió 19, 2013). Observem una proporció més elevada de proteïnes codificants en el ChIP-seq de PCAF que en el de p27. Per contra, trobem un increment en la proporció de pseudogens i RNAs no codificants, sobretot d'aquest últim grup, en el ChIP-seq de p27 en comparació amb el de PCAF.

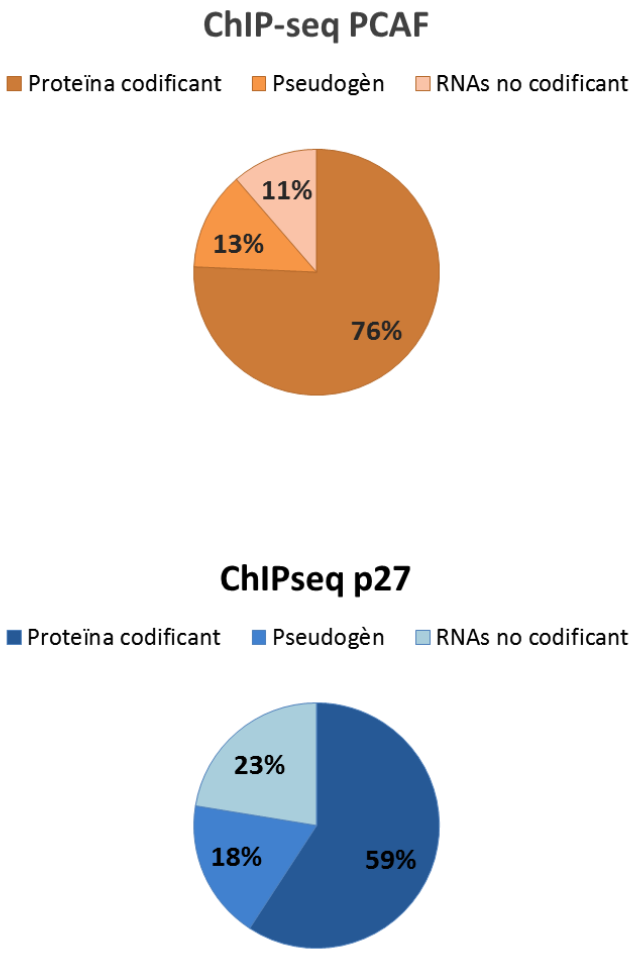


Figura 23. Classificació dels gens enriquits en el ChIP-seq de PCAF i de p27 en HCT116 segons el seu biotipus. Classificació adaptada dels diferents biotipus en que podem diferenciar els gens o productes gènics (ENCODE i Ensmbl). Proteïna codificant engloba també les cadenes lleugeres de les immunoglobulines. Pseudogèn engloba pseudogèn-processat, pseudogèn no processat i retrotransposó; i finalment en l'últim grup, a part de tots els RNAs no codificants també hi trobem els pseudogens de RNAs no codificants.

- **Anàlisi d'agrupació funcional**

Hem analitzat els gens que presenten pics significatius en els experiments de ChIP-seq per tal de definir-ne la seva ontologia gènica. És a dir, agrupar-los segons la seva funció molecular, el seu rol en els processos biològics i la seva distribució en els compartiments cel·lulars.

Per realitzar aquest tipus d'anàlisi, treballarem amb els pics que es troben en gens que codifiquen per a proteïnes. Dels 1012 gens del ChIP-seq de p27, 597 codifiquen per a proteïnes. Dels 6131 gens del ChIP-seq de PCAF, 4623 corresponen a gens codificants per proteïnes. Aquests gens seran els emprats en l'estudi funcional.

Utilitzem dues aproximacions per a definir l'ontologia gènica dels dos grups de gens. Primer de tot utilitzarem el DAVID que ens permetrà fer una classificació acurada fins a uns 3000 gens i posteriorment el programa GiTools que ens permetrà comparar les ontologies gèniques del ChIP-seq de PCAF i de p27 visualitzant-ho en *heatmaps*.

Emprant el programa DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v6.7) veiem representats els grups més enriquits en els quals s'agrupen els processos biològics dels gens significatius del ChIP-seq de p27 i de PCAF. Els valors d'enriquiment ens mostren la importància d'aquell grup, per tant, com més baixos siguin els p-valors dels membres del grup, major serà el seu valor d'enriquiment. No obstant això, cal tenir en compte que el DAVID considera altres factors a banda del p-valor, és per això que podem trobar membres del GO (*gene ontology*) amb un p-valor alt formant part de grups enriquits.

En les **Figures 24 i 25** mostrem els 20 grups més enriquits de l'anàlisi, però cal considerar tots els grups com enriquits (Huang et al. 2009b; Huang et al. 2009a).

En el cas de p27, els grups amb un enriquiment més elevat, és a dir amb una significació més elevada, estan relacionats amb l'adhesió cel·lular, la diferenciació neuronal, la senyalització cel·lular i el transport iònic (**Figura 24**). Aquest resultats són innovadors, ja que fins ara p27 s'ha relacionat amb el cicle cel·lular i la seva unió a regions properes a gens involucrats en aquests processos pot ser rellevant en la funció de p27 com a regulador transcripcional. Curiosament no observem que hi hagi una unió específica de p27 a la cromatina de gens relacionats amb el cicle cel·lular.

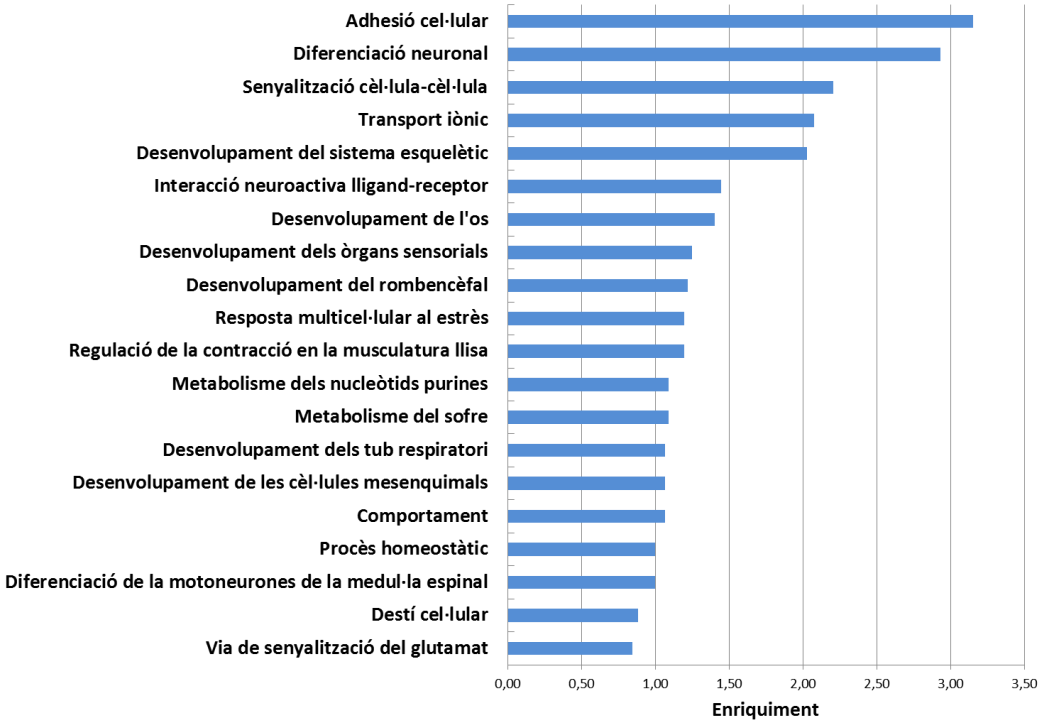


Figura 24. Agrupació funcional dels gens associats als pics del ChIP-seq de p27. Mostrem 20 dels grups de gens més enriquits. Veiem que predominen les funcions involucrades en l'adhesió cel·lular, la diferenciació neuronal, el transport iònic i la senyalització cel·lular. S'ha utilitzat el programa DAVID. Valor d'enriquiment per sobre 0.8.

Per analitzar els gens d'unió a PCAF amb el recurs del DAVID necessitem analitzar-los en dos grups ja que no permet l'anàlisi de més de 3000 gens a la vegada. Així doncs, decidim que una bona manera de separar-los és segons si els pics relacionats amb aquests gens es troben en la zona intragènica (dins el cos del gen, *inside*) o intergènica (*upstream* o *downstream* del gen). En la zona intragènica trobem 2242 gens i en la intergènica 2894.

En l'agrupació intragènica veiem un elevat enriquiment de processos biològics com el transport iònic, l'adhesió cel·lular, la senyalització cel·lular i la diferenciació neuronal; per aquest ordre (**Figura 25A**). Aquests grups funcionals coincideixen totalment amb l'agrupació que hem obtingut amb els gens del ChIP-seq de p27. En els gens d'unió intergènica a PCAF observem també enriquiment en els grups funcionals relacionats amb l'adhesió cel·lular, el desenvolupament neuronal i la senyalització cel·lular però no en el transport iònic (**Figura 25B**) .

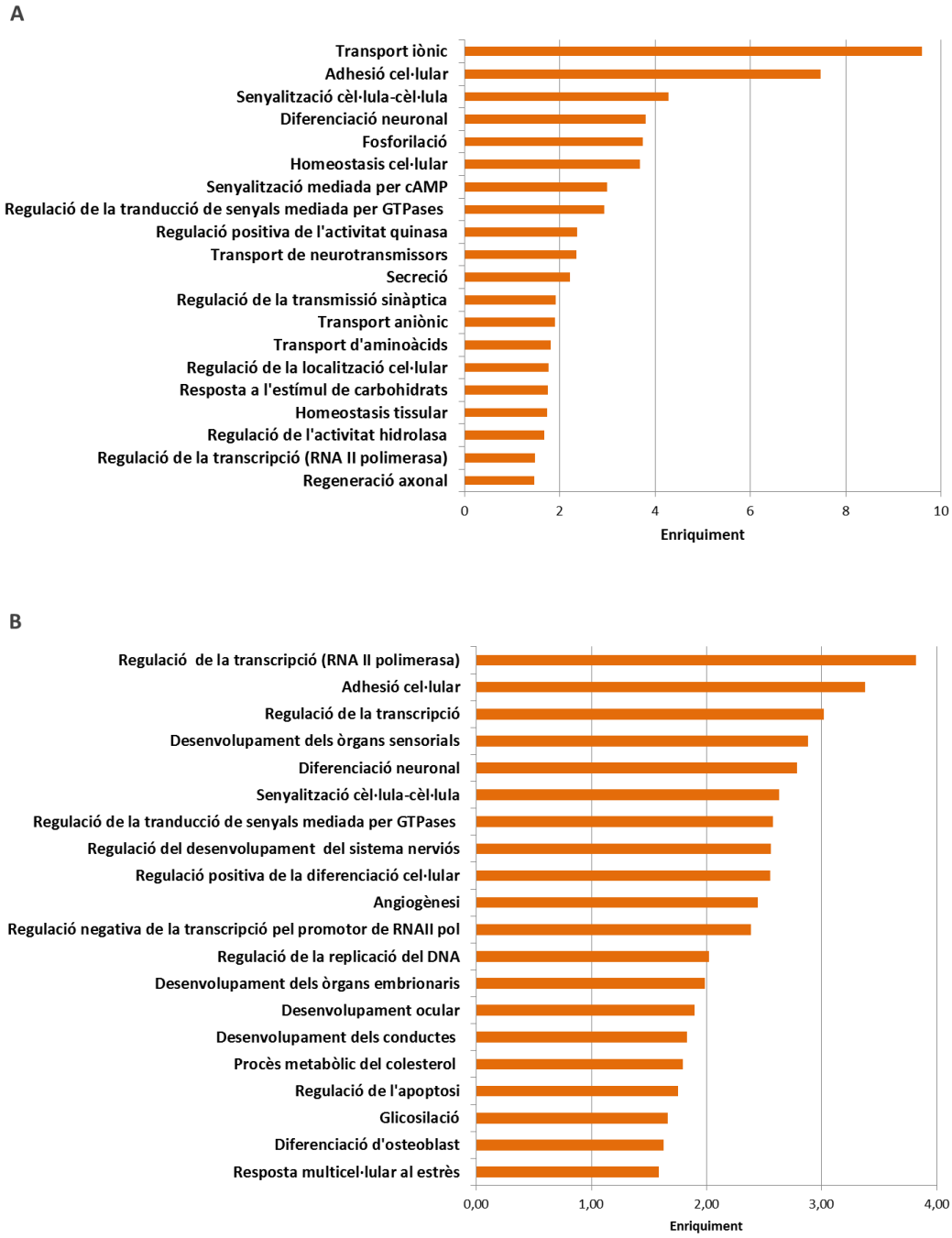


Figura 25. Agrupació funcional dels gens associats als pics del ChIP-seq de PCAF. Mostrem 20 dels grups de gens més enriquits. Veiem que predominen les funcions involucrades en l'adhesió cel·lular, la diferenciació neuronal, el transport iònic i la senyalització cel·lular. **(A)**. Gens amb pics intragènics del ChIP-seq de PCAF. **(B)** Gens amb pics intergènics del ChIP-seq de PCAF. S'ha utilitzat el programa DAVID. Valor enriquiment per sobre 1.5.

Podem concloure que els processos biològics més significatius dels quals formen part els gens potencialment regulats per p27 o PCAF, són els mateixos. Aquest resultat ens encamina en la nostra hipòtesi de que p27 i PCAF jugarien un paper conjunt en la regulació transcripcional dels seus gens diana. Aquests grups funcionals ens serviran més endavant per a definir les vies funcionals més enriquides.

Tornant a l'ontologia intergènica del ChIP-seq de PCAF (**Figura 25B**), observem un important enriquiment en grups involucrats en la regulació de la transcripció, sobretot en la transcripció mitjançant la polimerasa RNAII. Aquest fet concorda perfectament amb la funció de PCAF com a coactivador transcripcional. En l'agrupació de la zona intragènica d'unió a PCAF, a banda dels 4 grups principals comuns amb p27, els grups enriquits estan vinculats sobretot a homeòstasis, a diversos aspectes del metabolisme de la cèl·lula, a l'apoptosi i hi trobem un parell de grups involucrats en la transcripció (també mitjançant la polimerasa RNAII) però són menys significatius que els grups sorgits de l'anàlisi intergènic del ChIP-seq de PCAF.

Això ens diu que malgrat les similituds entre els anàlisis dels gens associats a les dues zones gèniques, el grups funcionals varien segons la zona d'unió de PCAF en els seus gens diana.

En la **Figura 26** emprant l'eina GiTools veiem representats els processos biològics en els quals s'agrupen els gens significatius del ChIP-seq de PCAF i el de p27. Al comparar-los podem concloure que coincideixen en els processos implicats en l'adhesió cel·lular, el transport iònic i la neurogènesi. De fet, tots els grups de processos biològics on s'han classificat els gens del ChIP-seq de p27 s'inclouen dins els grups del ChIP-seq de PCAF, amb l'excepció del procés de reconeixement neuronal, exclusiu per a p27. PCAF a més la trobem associada a gens implicats en la regulació de la senyalització i l'homeòstasi cel·lular.

Aquest anàlisis ens dóna una informació molt valuosa per a determinar vies comuns on podrien estar implicats PCAF i p27.

També analitzem les funcions moleculars (**Figura 27**) en les que estan implicades aquests gens. Al enfrontar les dades de p27 i PCAF veiem que bàsicament coincideixen en gens relacionats amb els canals iònics i el transport transmembrana.

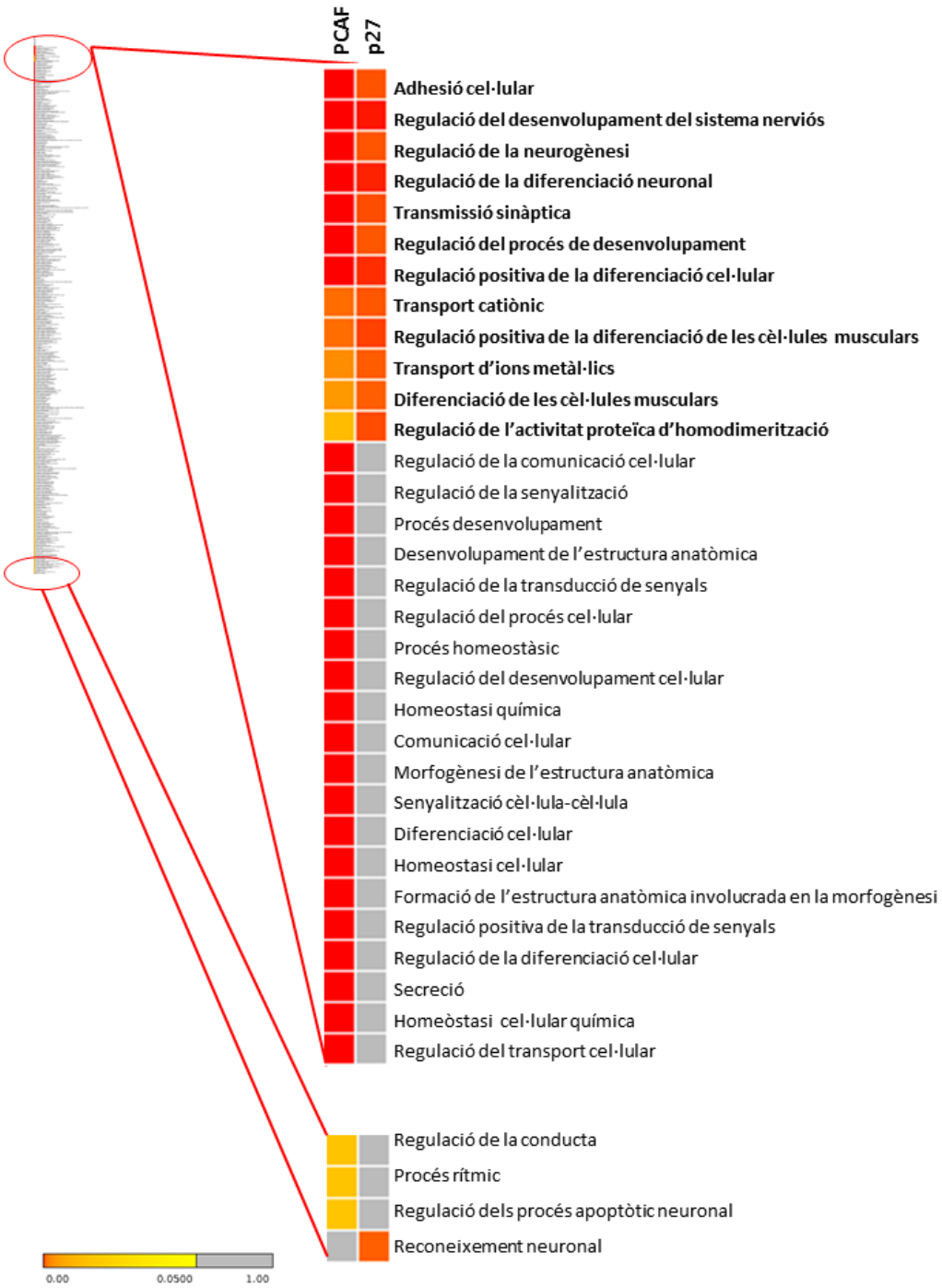


Figura 26. Agrupació funcional dels processos biològics dels gens associats als pics del ChIP-seq de p27 i PCAF. *Heatmap* dels processos biològics significatius (veure escala al peu de la figura) en les quals estan implicats els gens associats als pics significatius del ChIP-seq de PCAF i de p27 en HCT116. S'ha utilitzat el programa Gitools.

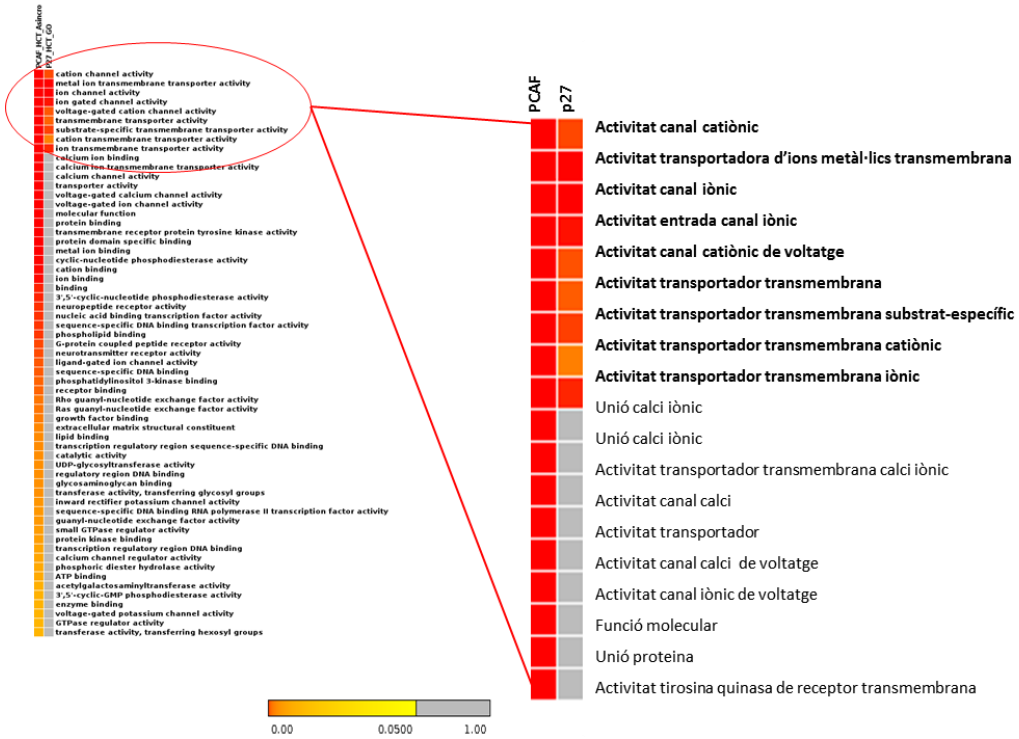


Figura 27. Agrupació funcional de les funcions moleculars dels gens associats als pics del ChIP-seq de p27 i PCAF. *Heatmap* de les funcions moleculars significatives (veure escala al peu de la figura) en les quals estan implicats els gens associats als pics significatius del ChIP-seq de PCAF i de p27 en HCT116. S'ha utilitzat el programa Gitools.

- Motius d'unió al DNA de p27 i PCAF

Per tal de generar els possibles motius d'unió de p27 i PCAF al DNA s'han utilitzat seqüències de 100bp des del centre dels 1000 pics més significatius (amb un *fold-change* major respecte la mostra control) obtinguts en l'anàlisi del ChIP-seqs. S'ha utilitzat l'eina MEME (Bailey & Elkan 1994) per generar els motius *in silico* i ens ha donat 2 motius per a p27 i 3 per a PCAF (**Figura 28**). Aquest programa assigna un E-valor (probabilitat de trobar un patró igualment conservat en seqüències a l'atzar) per a cada motiu. No existeix coincidència entre els motius d'unió a DNA de p27 i PCAF.

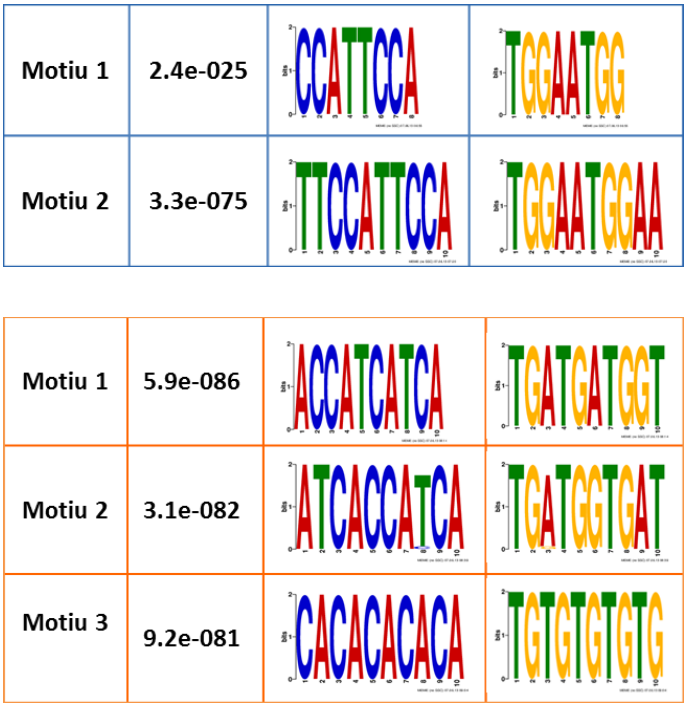


Figura 28. Anàlisi dels motius d'unió al DNA de p27 i PCAF. S'han analitzat les seqüències de 100bp dels 1000 pics més significatius del ChIP-seq de p27 (dalt, blau) i PCAF (baix, taronja), utilitzant el programa MEME. Es mostra el E-valor per a cada motiu, generat per MEME.

- **Enriquiment de motius d'unió a Factors de Transcripció d'unió en els pics d'interacció de p27 i PCAF amb la cromatina**

S'han analitzat *in silico* els factors de transcripció que poden unir-se als pics o zones d'unió significatives de p27 o PCAF al DNA. S'han utilitzat fragments de 150bp, 75bp per sobre i 75bp per sota dels pics del ChIP-seq, i els factors de transcripció que trobem significativament (*p-value*<0,05) units a aquests pics s'han representat en un *heatmap* en que es comparen els resultats per p27 i PCAF (**Figura 29**). S'ha emprat l'eina STORM per a l'escaneig dels pics amb els motius corresponents als factors de transcripció (TFBS, *Transcription Factor Binding Site*) de la base de dades TRANSFAC.

Curiosament, només ens apareix un factor significatiu en les zones on trobem p27, el PAX5 (p-valor local: 3.19e-05). PAX5 pertany a la família PAX (*Paired box genes*) que consta de 9 gens, classificats en 4 grups, que codifiquen factors de transcripció nuclears implicats en el control del desenvolupament. S'ha vist com alteracions genètiques en aquests gens interfereixen directament en transcripció de gens que

regulen la diferenciació cel·lular, la proliferació, la migració i supervivència i poden contribuir a la oncogènesi (Wang et al. 2008). Aquest anàlisi ens posa sobre la pista d'un possible mecanisme pel qual p27 podria estar regulant la transcripció.

Per contra, trobem molts possibles candidats en les zones d'unió de PCAF al DNA. Es tracta de factors de transcripció molt diversos, entre els quals hi ha diversos membres de la família PAX. Concretament, el PAX5 és un dels factors de transcripció més significatius en les zones d'unió a PCAF.

El fet que apareguin tants possibles factors de transcripció en zones de la cromatina d'unió a PCAF s'explicaria per la seva llargament descrita funció com acetilador de factors de transcripció i, per altra banda, perquè se sap que la seva unió a factors de transcripció específics provoca el reclutament de PCAF al DNA.

Finalment, el fet que només ens aparegui un factor de transcripció en l'anàlisi de p27 podria ser perquè té una funció més específica en la regulació de la transcripció i no tant generalitzada com PCAF. Podria ser que p27 la porti a terme mitjançant PAX5 en aquest tipus cel·lular.

Aquest resultat ens dóna una previsió interessant per a un posterior estudi *in vivo*.

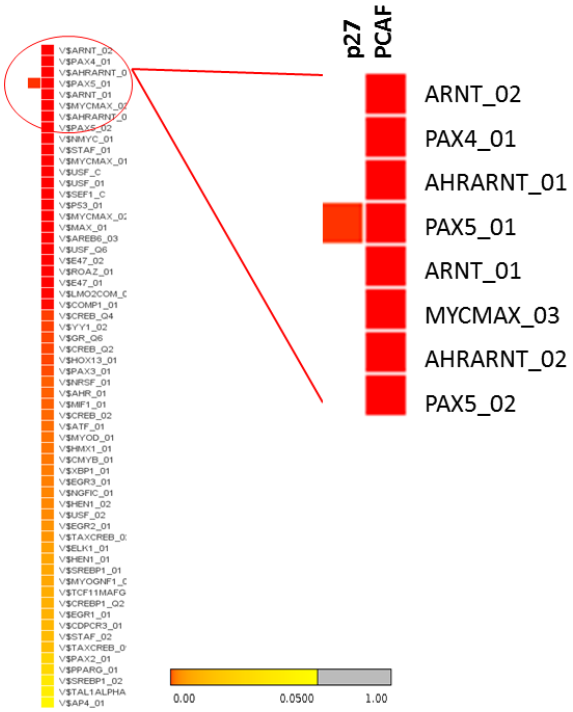


Figura 29. Anàlisi dels factors de transcripció d'unió als pics del ChIP-seq de p27 i PCAF. *Heatmap* dels motius corresponent als factors de transcripció d'unió significativa als pics de p27 i PCAF (p-valor<0,05). Eina informàtica emprada: STORM. Base de dades factors de transcripció: TRANSFAC. Representació gràfica: GiTools.

- **Pics d'interacció comuns de p27 i PCAF amb la cromatina**

Ens interessa saber si p27 i PCAF col·laboren en la transcripció de gens específics. Per això, hem fet una superposició dels pics dels dos ChIP-seqs, per veure si s'uneixen sobre el mateix lloc en la cromatina.

Al comparar els pics observem que 140 coincideixen físicament. D'aquests, 23 estan en gens codificants per a proteïnes (**Taula 9**). Tenint en compte el total de gens d'ambdós ChIP-seqs, podem concloure que aquests 23 gens, on p27 i PCAF comparteixen exactament la mateixa localització en la cromatina, no són una proporció significativa dins del total de gens als que s'uneixen. Podem concloure doncs, que p27 i PCAF no comparteixen la seva localització d'unió a la cromatina.

Taula 9. Pics superposats del ChIP-seq de PCAF i de p27 en HCT116, que corresponen a proteïna codificant.

#Cromosoma	Localització tànscrit	Símbol gen
chr1	upstream	C1orf174
chr1	upstream	C1orf68
chr1	downstream	AC138393.2-1
chr2	upstream	AC027612.6-2
chr2	upstream	AC140485.3
chr2	inside	DPP10
chr3	downstream	CHL1
chr4	downstream	HSP90AA4P
chr6	upstream	AL033381.2-1
chr7	downstream	RAMP3
chr7	downstream	ZNF716
chr8	downstream	AC093331.9-4
chr12	upstream	TMTC1
chr14	downstream	C14orf177
chr16	downstream	AC133561.4
chr17	downstream	TBC1D3F
chr20	inside	C20orf91
chr20	upstream	DEFB115
chr21	upstream	IGHV1OR15-9
chr21	downstream	AL592528.1
chr22	upstream	DGCR6
chrY	downstream	AC134882.2-3
chrY	upstream	AC134882.2-4

En canvi, quan busquem els gens que presenten alhora pics d'unió a p27 i a PCAF encara que aquests pics no es solapin, trobem que 1282 pics de p27 compleixen aquestes condicions. Com que el total de pics significatius en el ChIP-seq de p27 és de 1981, això ens indica que en la majoria dels gens on trobem pics d'unió a p27 també hi trobarem pics de PCAF.

Aquests 1282 pics corresponen a 448 gens. Com anteriorment hem comentat, p27 s'uneix a un total de 1012 gens, per tant, podem afirmar que la meitat dels gens d'unió a p27 també s'uneixen a PCAF.

D'aquests 448 gens 269 són gens codificants per a proteïnes, la resta formen part d'un altre biotipus, que no ens interessaran per a l'estudi funcional que volem fer. Com ja sabem, p27 s'uneix a un total de 597 gens codificants de proteïna, podem concloure doncs, que en la meitat d'aquests gens als que s'uneix p27 també s'uneix PCAF (**Figura 30**). Cal recordar però que, en la gran majoria dels casos, els llocs d'unió a la cromatina d'ambdues proteïnes no es solapen.

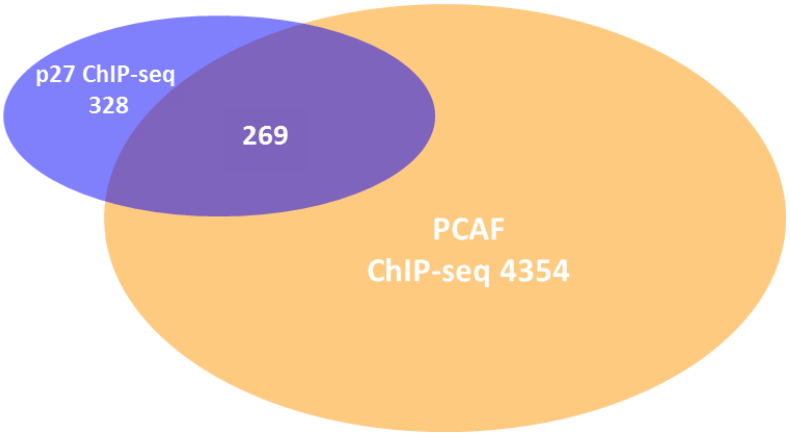


Figura 30. Representació dels gens codificants per proteïna compartits entre el ChIP-seq de PCAF i el ChIP-seq de p27 en HCT116.

Procedim a analitzar l'ontologia gènica d'aquests 269 gens amb el programa DAVID. Agrupant funcionalment aquests gens comuns de p27 i de PCAF, observem que els grups més enriquits són: el transport iònic, l'adhesió cel·lular, la neurogènesi i la senyalització cel·lular (**Figura 31**). Destaquem aquí, la coincidència amb els grups obtinguts en l'anàlisi funcional complet dels ChIP-seqs de p27 i PCAF.

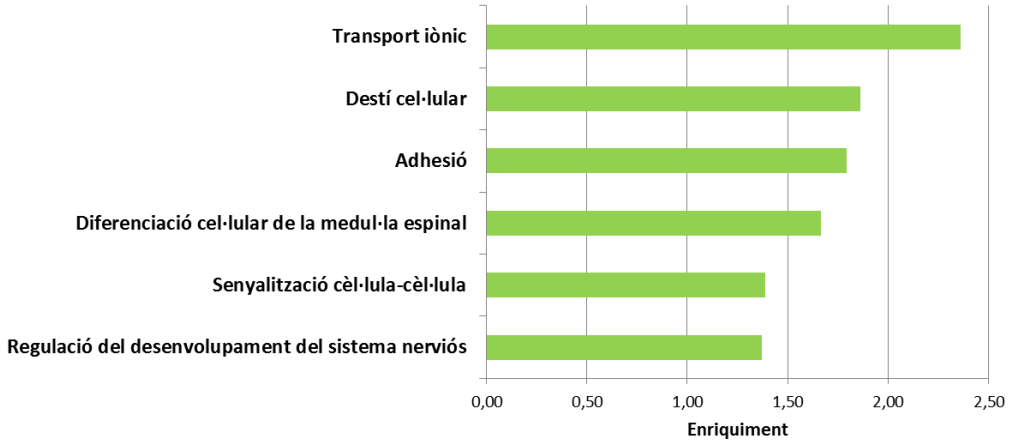


Figura 31. Agrupació funcional dels gens comuns entre el ChIP-seq de p27 i el de PCAF. Mostrem els grups funcionals de gens més enriquits (Valor enriquiment > 1.3). Veiem que predominen les funcions involucrades en el transport iònic, l'adhesió cel·lular, i la senyalització cel·lular. S'ha utilitzat el programa infromàtic DAVID.

Per tal de fer un estudi funcional de la regulació transcripcional duta a terme conjuntament per PCAF i p27, volem seleccionar alguns d'aquests gens comuns que es trobin involucrats dins dels grups funcionals obtinguts.

Seleccionem gens implicats en la senyalització cel·lular i els classifiquem segons el seu paper en les vies de senyalització. Escollim 14 gens amb diferents funcions dins d'aquestes vies de senyalització cel·lular: receptors (GABRG2, GHR, GRIN3A, IGF1R, ROBO1 i UNC5D), lligands (IL7), GTPases (ARHGEF7, RERGL i SPAG9), factors de transcripció (GLI3, ZNF716) i també vinculats a diversos processos cel·lulars com l'apoptosi (CRBN) i la neurogènesi (DGCR6) . En la **Taula 10** mostrem la informació dels pics en els ChIP-seq de p27 i de PCAF en aquests gens escollits.

Taula 10. Informació dels pics del ChIP-seq de p27 i PCAF en els 14 gens escollits.

	ChIP-seq	Cromosoma	Inici	Final	*Fold enrichment*	Localització tràscrit	Distància fins al tràncrit
Receptors							
GABRG2	p27	chr5	161583970	161584252	9,91	downstream	156675
	PCAF	chr5	161580341	161580611	11,44	downstream	153046
GHR	p27	chr5	42434475	42434749	8,49	upstream	-25308
	PCAF	chr5	42267322	42267561	10,01	upstream	-192461
GRIN3A	p27	chr9	103520403	103520670	8,49	inside	20280
	PCAF	chr9	103539425	103539691	8,58	inside	1258
IGF1R	p27	chr15	97121406	97121648	9,91	inside	111104
	PCAF	chr15	97135969	97136244	11,86	inside	125667
	PCAF	chr15	96961148	96961421	8,46	upstream	-49154
ROBO1	p27	chr3	79257543	79257776	9,83	upstream	-163
	PCAF	chr3	80182644	80183002	11,44	upstream	-460893
	PCAF	chr3	80060831	80061238	10,15	upstream	-339080
UNC5D	p27	chr8	35345752	35346062	8,49	inside	132907
	p27	chr8	35652578	35652839	8,49	inside	131126
	PCAF	chr8	35828412	35828659	8,58	downstream	306960
Lligand							
IL7	p27	chr8	80047436	80047703	11,32	upstream	-167123
	p27	chr8	80007304	80007574	9,91	upstream	-126991
	PCAF	chr8	79892345	79892640	7,98	upstream	-12032
SPAG9	p27	chr17	46415723	46416022	8,9	inside	63547
	PCAF	chr17	46406076	46406443	8,87	inside	73194
GTPAses							
ARHGEF7	p27	chr13	110645835	110646168	6,97	upstream	-9802
	PCAF	chr13	110492766	110493092	10,15	upstream	-73017
RERGL	p27	chr12	18151836	18152131	11,32	upstream	-17455
	PCAF	chr12	17993973	17994265	12,87	downstream	140408
Apoptosis i E3 lligasa							
CRBN	p27	chr3	3355488	3355749	9,64	upstream	-159098
	p27	chr3	3328299	3328565	11,32	upstream	-131909
	PCAF	chr3	3417081	3417428	11,44	upstream	-220691
TF							
GLI3	p27	chr7	42180561	42180853	11,32	inside	48859
	PCAF	chr7	42190975	42191217	8,12	inside	38445
ZNF716	p27	chr7	57555151	57555705	7,79	downstream	41320
	PCAF	chr7	57555035	57555523	7,7	downstream	41204
Adhesió i neurogènesi							
DGCR6	p27	chr22	17263635	17264251	9,48	upstream	-10144
	PCAF	chr22	17263972	17264283	8,79	upstream	-9807

2. Microarrays i ChIP-seqs

- Microarray d'expressió en cèl·lules HCT116 *knockdown* de PCAF

Paral·lelament als experiments de ChIP-seq vam voler determinar quins gens es trobaven regulats per PCAF. Per tal d'assolir aquest objectiu hem fet ús de microarrays d'expressió. Els nivells d'expressió gènica en cèl·lules HCT116 kd (*knockdown*) de PCAF van ser comparades amb cèl·lules control (sh(-)) que expressaven PCAF normalment. D'aquesta manera vam poder determinar els gens que s'expressen de forma diferencial en presència o absència de PCAF. Vam identificar 852 gens que s'expressaven diferencialment en les cèl·lules kd versus les control. D'aquests gens 610 augmentaven i 324 disminuïen.

Al analitzar l'ontologia d'aquests gens (amb el programa DAVID) vam observar que el grup biològic més enriquit era el cicle cel·lular (**Figura 32**). Aquest fet ens posiciona PCAF dins de la que és la funció principal de p27 i corrobora diverses investigacions (Ha et al. 2009; Mateo et al. 2009). També apareixen enriquits la traducció i l'apoptosi.

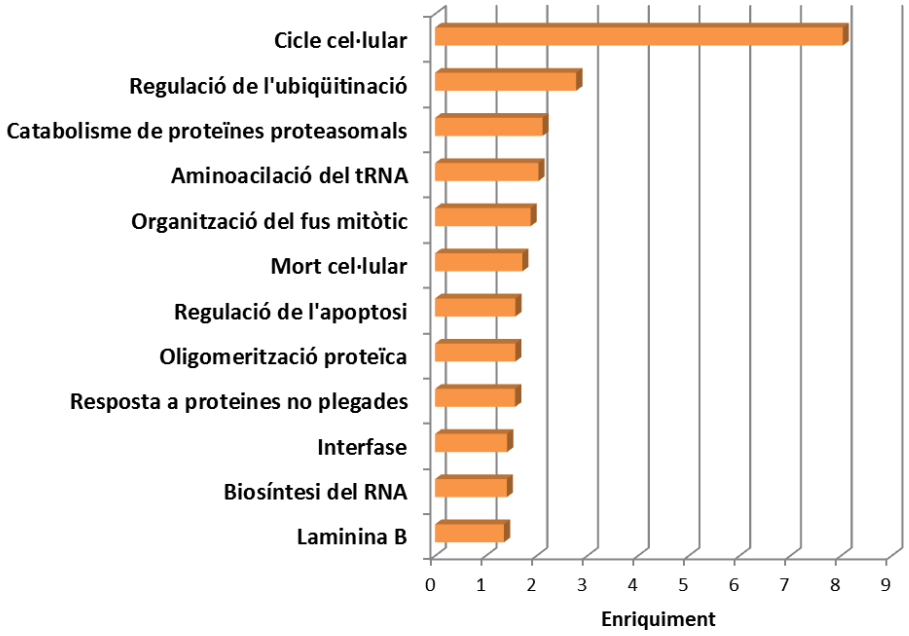


Figura 32. Agrupació funcional dels gens que modifiquen la seva expressió de forma significativa en el microarray d'expressió en cèl·lules shPCAF. Mostrem els grups de gens més enriquits (Valor enriquiment > 1.3) emprant l'eina informàtica DAVID. Veiem que predominen les funcions involucrades en el cicle cel·lular, l'apoptosi i la traducció.

Curiosament, al analitzar per separat l'ontologia gènica dels gens que es troben *up*-regulats dels que es trobem *down*-regulats en el microarray de shPCAF veiem que funcionalment aquests dos grups són molt diferents. Els gens *up*-regulats estan majoritàriament relacionats amb la traducció i l'apoptosi (**Figura 33A**) mentre que els *down*-regulats estan relacionats amb el cicle cel·lular i també amb la transcripció i l'splicing (**Figura 33B**).

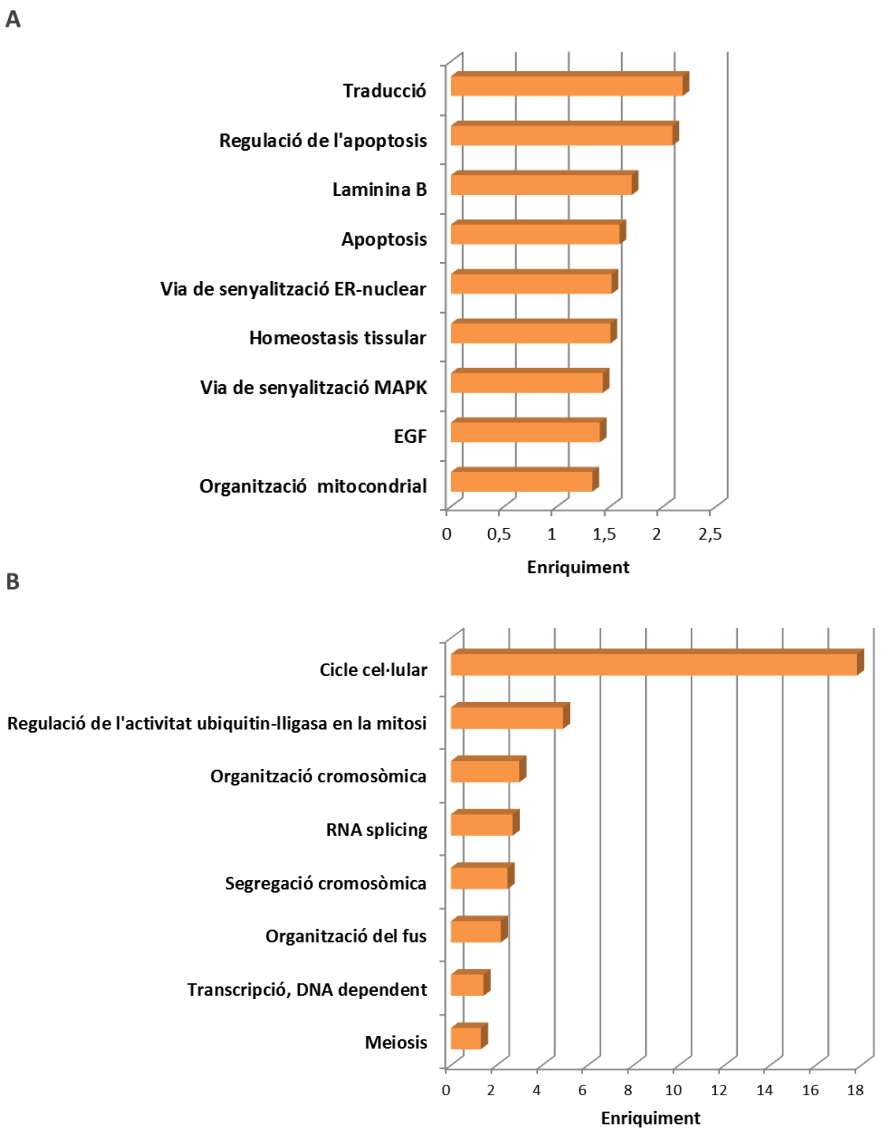


Figura 33. Agrupació funcional dels gens que modifiquen la seva expressió de forma significativa en el microarray d'expressió en cèl·lules shPCAF. Mostrem els grups de gens més enriquits (Valor enriquiment > 1.3) emprant l'eina informàtica DAVID. **(A)** Gens *up*-regulats, predominen les funcions involucrades en la traducció i l'apoptosi. **(B)** Gens *down*-regulats, predominen les funcions vinculades al cicle cel·lular i a la transcripció.

- **Microarray i ChIP-seq**

A continuació comparem els gens que presenten una expressió diferencial en el microarray d'expressió de cèl·lules shPCAF (852 gens) amb els gens que codifiquen per a proteïnes corresponents als pics en el ChIP-seq de PCAF (4623). La comparació ens revela que hi ha 156 gens comuns. En canvi, al comparar el microarray amb els gens codificants per a proteïnes del ChIP-seq de p27 (597) només trobem 13 coincidències (**Figura 34**). Aquests 156 gens que presenten un lloc d'unió a PCAF i que la seva expressió està modificada en absència de PCAF els considerem que són dianes directes de PCAF.

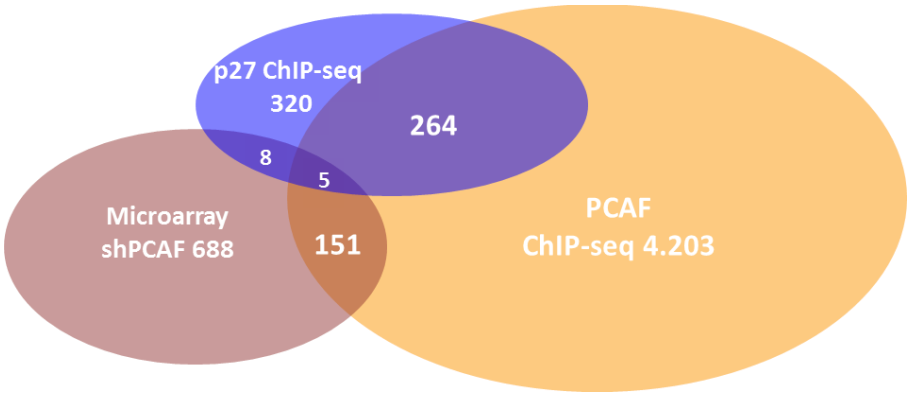


Figura 34. Representació dels gens compartits entre el microarray d'expressió en cèl·lules shPCAF, el ChIP-seq de PCAF i el ChIP-seq de p27 en HCT116.

3. Estudi funcional del paper de PCAF i p27 en la transcripció dels gens escollits

Primerament validem les dades del ChIP-seq. Per fer-ho dissenyem primers per als pics de p27 i de PCAF d'alguns dels gens escollits (GRIN3A, RERGL, UNC5D, ROBO1 i SPAG9). Representem l'enriquiment en aquestes pics respecte en una seqüència control (zona del ChIP-seq on no hi ha cap pic significatiu) en la **Figura 35**. Val a dir que no hem pogut aconseguir enriquiment en tots els gens. Això pot ser degut a un problema en el disseny del primers, caldria provar-ne d'altres.

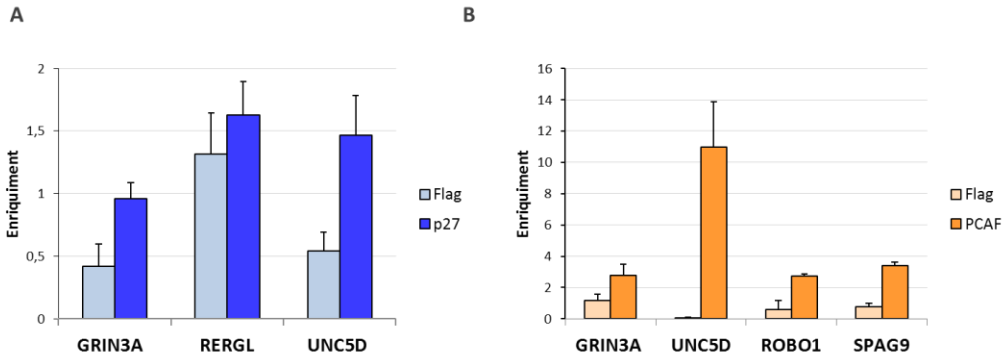


Figura 35. Enriquiment de p27 i PCAF en la cromatina dels pics del ChIP-seq corresponent. Anàlisi de la RT-PCR dels pics dels ChIP-seq corresponent a aquests gens en mostres de ChIP amb el següents anticossos: **(A)** Flag i p27 amb cromatina de cèl·lules HCT116 deprivades. **(B)** Flag i PCAF amb cromatina de cèl·lules HCT116 asincròniques. Cada barra del gràfic representa l'enriquiment del fragment de DNA del gen respecte l'enriquiment d'un fragment control ± SD de 2 experiments independents.

- Expressió gènica en cèl·lules HCT116 *knockdown* de p27 o PCAF

Per tal de determinar si l'expressió d'aquests gens depèn directament de p27 i de PCAF, en silenciem l'expressió mitjançant un shRNA. D'aquesta forma podrem identificar si aquests gens mostren una expressió diferencial en cèl·lules kd de p27 (shp27) i kd de (shPCAF) respecte a les cèl·lules control (sh(-), *random* shRNA) que mantenen les p27 i PCAF endògenes. Silenciem p27 i PCAF en HCT116 per infecció lentiviral amb una sèrie de 5 shRNAs, seleccionem les cèl·lules infectades amb puromicina i n'escollim els dos que més disminueixen els nivells proteics en aquestes cèl·lules (**Figura 36**). Aquest parell de shRNAs seran els que utilitzarem al llarg d'aquest treball. Observem en el WB l'efecte que la disminució de PCAF té sobre la proteïna p27, que augmenta.

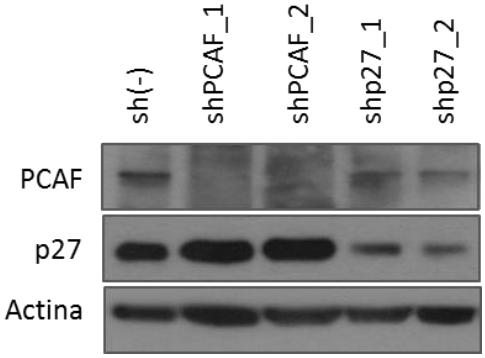


Figura 36. Producció de *knockdown* de p27 i de PCAF. Cèl·lules HCT116 són infectades amb lentivirals shRNA p27 o shRNA PCAF o sh(-) produïts en cèl·lules HEK293T. Les cèl·lules infectades són seleccionades durant una setmana amb puromicina i processades per a WB amb tampó de lisi 1% SDS. Els nivells de p27, PCAF i Actina són detectats amb els seus respectius anticossos.

Extraiem el mRNA de les cèl·lules silenciades per p27 i per RT-PCR mirem els nivells d'expressió dels gens seleccionats (es mostren els resultats amb el shp27_1) (**Figura 37**). Observem que el mRNA d'aquest gens està clarament augmentat en cèl·lules kd de p27 en comparació amb les cèl·lules control. Curiosament, veiem que els nivells de missatger de PCAF també es veuen molt augmentats.

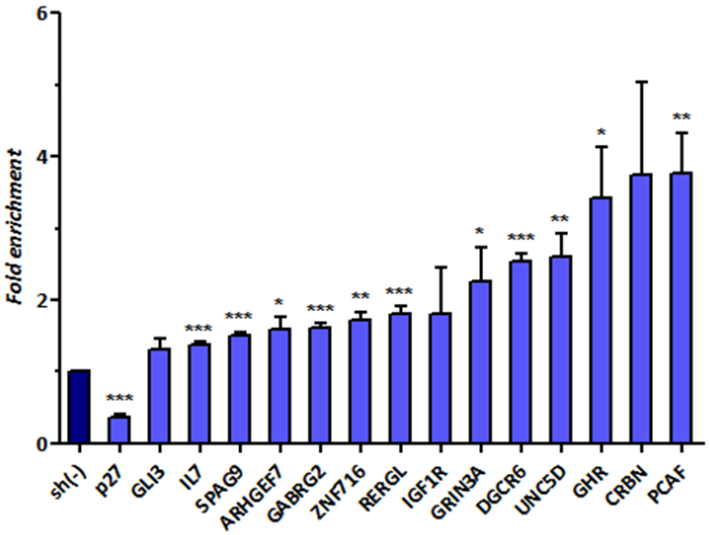


Figura 37. Nivells d'expressió gènica en cèl·lules *knockdown* de p27. Cèl·lules HCT116 són silenciades amb sh(-) o shp27. S'ha extret el RNA (Roche) i s'ha retrotranscrit a cDNA (RT-Vilo, Invitrogen) per a la seu posterior anàlisi de RT-PCR. L'expressió gènica és veu augmentada en aquests gens. El gràfic representa les mitjanes ± SEM (error estàndard) per cada gen de 5 experiments independents, utilitzant t-student ($p<0.05$), dades normalitzades al control sh(-) = 1.

Per contra, en les cèl·lules shPCAF l'expressió d'aquests gens es troba disminuïda respecte les cèl·lules control (es mostren els resultats amb el shPCAF_1) (**Figura 38**). Excepte el mRNA de p27 que es troba clarament augmentat.

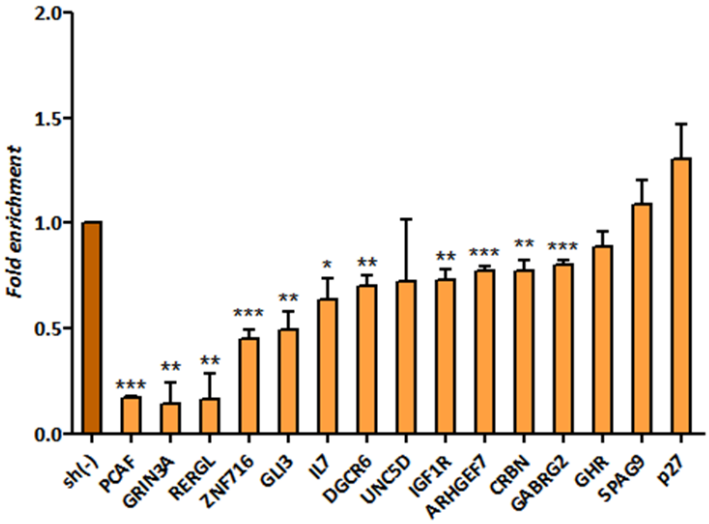


Figura 38. Nivells d'expressió gènica en cèl·lules *knockdown* de PCAF. Cèl·lules HCT116 són silenciades amb sh(-) o shPCAF. S'ha extret el RNA (Roche) i s'ha retrotranscrit a cDNA (RT-Vilo, Invitrogen) per a la seu posterior anàlisi de RT-PCR. L'expressió gènica d'aquests gens és veu disminuïda en cèl·lules shPCAF. El gràfic representa les mitjanes ± SEM per cada gen de 5 experiments independents, utilitzant t-student ($p<0.05$), dades normalitzades al control sh(-) = 1.

Així doncs, constatem que l'expressió gènica dels gens comuns de p27 i PCAF depèn de l'expressió d'aquestes dues proteïnes. Com ja hem comentat anteriorment, hi ha vàries evidències que constaten que p27 tindria funcions supressores sobre la transcripció dels seus gens diana, fet que encaixaria perfectament amb els nostres resultats. Quan disminuïm els nivells de p27, que estaria reprimint l'expressió dels seus gens diana, l'expressió d'aquests gens es veu augmentada.

El fet que PCAF sigui un coactivador transcripcional explica el fet que l'expressió dels seus gens diana es veu disminuïda quan disminuïm els nivells PCAF.

Fins ara, només havíem constatat que la sobrexpressió de PCAF feia disminuir p27 a nivell proteic i de forma inversa, els nivells de p27 augmentaven al silenciar PCAF (Perez-Luna et al. 2012) (**Figure 36**). Aquestes dades indiquen que PCAF estaria implicada en la degradació de p27. Però en aquests experiments de silenciament, veiem per primer cop com els nivells de mRNA de p27 és veuen augmentats en disminuir PCAF. Així, aquests resultats corroboren el que veiem a nivell proteic i

afegeixen un nou nivell de regulació ja que suggereixen que PCAF regula negativament l'expressió de p27 a nivell transcripcional.

Per contra, quan disminuïm p27 els nivells de mRNA de PCAF, al igual que els mRNAs dels seus gens diana, es veuen augmentats. Això indicaria que PCAF seria un gen diana de p27, encara que en el ChIP-seq no trobem unió de p27 sobre el gen de PCAF.

Ara, el que volem saber, és si el canvi en els nivells de mRNA d'aquests gens al disminuir p27 o PCAF és degut una regulació directa de la transcripció. Per assolir aquesta qüestió dissenyem *primers* que incloguin el primer exó i el primer intró del gen d'interès, això ens permetrà saber els nivells d'expressió del primer trànscrit immadur de mRNA. D'aquesta manera, sabrem si l'expressió del pre-mRNA (trànscrit immadur) es veu també modificat en aquestes cèl·lules (MacKenzie et al. 2013).

Determinem els nivells d'expressió del pre-mRNA per a sis dels gens que presentaven una expressió diferencial (un augment o disminució) més pronunciada en els kd de p27 o de PCAF respecte el seu control. En la **Figura 39A** veiem que efectivament la transcripció directa en aquests 6 gens es veu augmentada en cèl·lules shp27. Per tant, podem concloure quela regulació per p27 intervindria en la producció del primer trànscrit dels seus gens diana, es a dir, regularia la transcripció d'aquests gens.

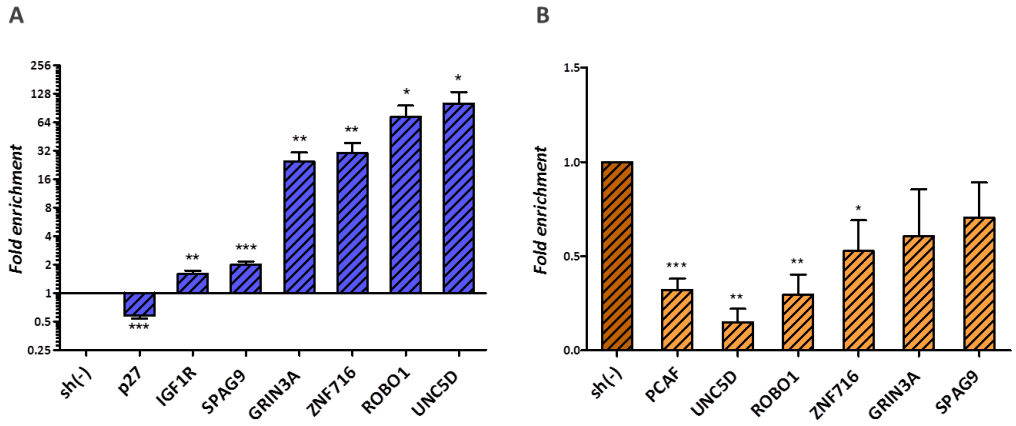


Figura 39. Nivells d'expressió del pre-mRNA en cèl·lules kd de p27 o PCAF. Cèl·lules HCT116 són silenciades amb sh(-) o shp27 o shPCAF. S'ha extret el RNA (Roche) i s'ha retrotranscrit a cDNA (RT-Vilo, Invitrogen) per a la seu posterior anàlisi de RT-PCR. El gràfic representa les mitjanes ± SEM per cada gen de 5 experiments independents, utilitzant t-student ($p<0.05$), dades normalitzades al control sh(-) = 1. **(A)** En el kd de p27 la transcripció del pre-mRNA és veu augmentada en aquests gens. Escala log2. **(B)** En el kd de PCAF la transcripció del pre-mRNA és veu disminuïda en aquests gens.

En cèl·lules shPCAF trobem que l'expressió del pre-mRNA en aquests gens també està disminuïda (**Figura 39B**), tal com passava en els nivells de mRNA. Tot i que la disminució no és tant pronunciada en el pre-mRNA com en el mRNA. Aquest fet ens indica que la regulació de PCAF actua directament sobre la transcripció dels seus gens diana.

Per confirmar que aquests resultats obtinguts en cèl·lules de còlon HCT116 no són exclusius per a aquesta línia cel·lular, hem repetit els experiments en cèl·lules de càncer de mama MCF-7. Obtenim els kds de p27 o PCAF pel mateix procediment utilitzat en les cèl·lules HCT116 (**Figura 40A**) i procedim al anàlisi de l'estat del mRNA i pre-mRNA de 3 dels gens que presentaven una variació més accentuada en les cèl·lules kd: GRIN3A, ROBO1 i SPAG9.

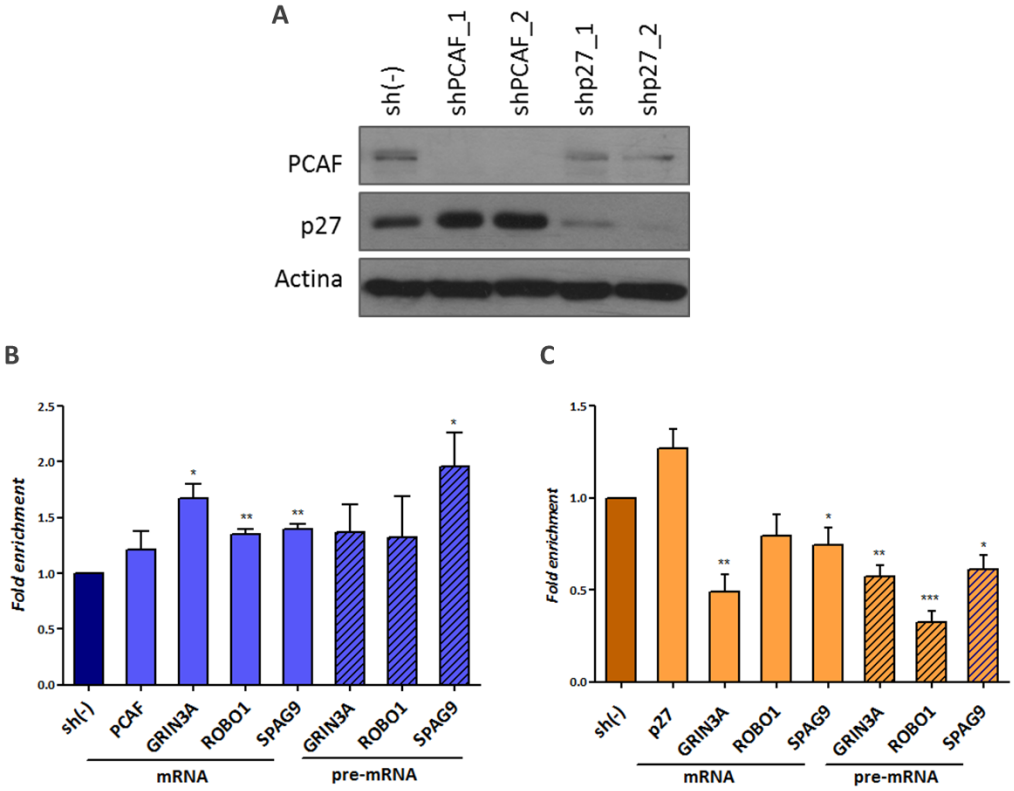


Figura 40. Nivells d'expressió gènica en cèl·lules *knockdown* de PCAF. (A) Producció de *knockdown* de p27 i de PCAF, cèl·lules MCF-7 són infectades amb lentivirals shRNA p27 o shRNA PCAF o sh(-) produïts en cèl·lules HEK293T. Les cèl·lules infectades són seleccionades durant una setmana amb puromicina i processades per a WB amb tampó de lisi 1% SDS. Els nivells de p27, PCAF i Actina són detectats amb els seus respectius anticossos. **(B)** S'ha extret el RNA i s'ha retrotranscrit a cDNA per a la seu posterior anàlisi de RT-PCR. El gràfic representa les mitjanes ± SEM per cada gen de 3 experiments independents, utilitzant t-student ($p<0.05$), dades normalitzades al control sh(-) = 1. En el kd de p27 la transcripció del mRNA i del pre-mRNA és veu augmentada en aquests gens. **(C)** Igual que en (B) però en kd de PCAF, la transcripció del mRNA i del pre-mRNA és veu disminuïda en aquests gens.

Quan silenciem p27 la transcripció d'aquests gens està augmentada, la transcripció de PCAF també apareix elevada, encara que no tant clarament (**Figura 40B**). El pre-mRNA d'aquests gens presenta una tendència a l'alça, tot i que la variabilitat entre mostres és més elevada.

En cèl·lules MCF-7 kd de PCAF la resposta transcripcional d'aquests 3 gens dianes de p27 i PCAF és la mateixa que en les cèl·lules HCT116, disminueix tant el mRNA com el pre-mRNA (**Figura 40C**). Aquí si que veiem una disminució pronunciada en el pre-mRNA. Així mateix, en aquestes cèl·lules també veiem que el mRNA de p27 està augmentat, al igual que el seus nivells de proteïna, com en les HCT116.

- **Expressió gènica en cèl·lules HCT116 que sobrexpressen p27 o PCAF**

Un cop vist l'efecte del silenciament de p27 o de PCAF sobre la regulació transcripcional dels seus gens diana volem saber l'efecte que tindria la sobrexpressió de p27 o de PCAF en aquests gens (**Figura 41**).

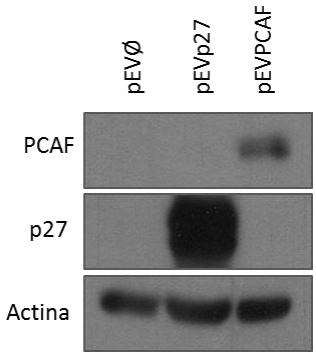


Figura 41. Comprovació de la sobrexpressió de p27 i PCAF. Cèl·lules HCT116 són transfectades amb pEVØ, pEVp27 o pEVPCAF. A les 24h són processades per a WB amb tampó de lisi 1% SDS. Els nivells de p27, PCAF i Actina són detectats amb els seus respectius anticossos.

Quan sobrexpressem p27 esperaríem un efecte contrari al del silenciament en quant a la regulació gènica d'aquests gens, no obstant, al sobrexpressar p27 també trobem que la transcripció d'aquests gens està augmentada (**Figura 42A i B**). Tot i que, l'augment no es estadísticament significatiu, ja que en aquests experiments ens trobem amb molta variabilitat en els resultats. El grau de sobreexpressio de la proteïna varia molt entre cada experiment. Cal tenir en compte també, que aquest

sistema de transfecció no permet la selecció, per la qual cosa, la mostra de cèl·lules sobrexpressades dependrà absolutament de l'eficiència de transfecció d'aquestes cèl·lules, que no és gaire elevada, i per tant, quedarà diluïda per la resta de cèl·lules no transfectades.

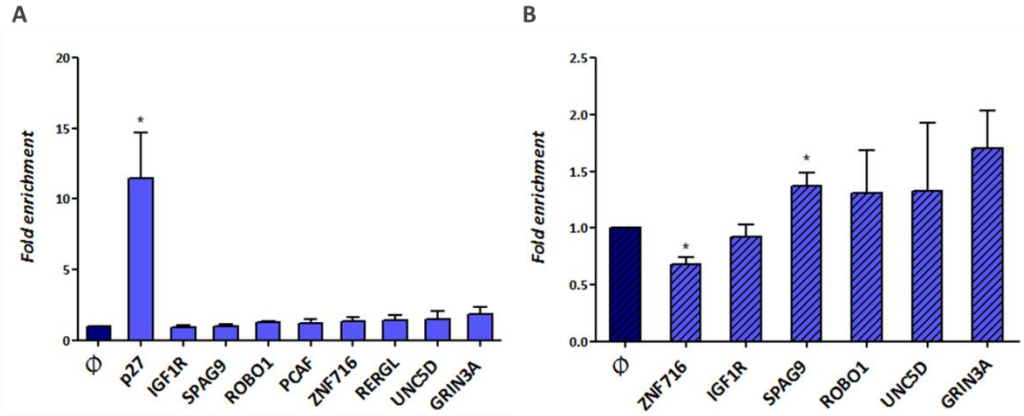


Figura 42. Nivells d'expressió gènica al sobrexpressar p27. (A) Cèl·lules HCT116 transfectades amb pEVØ o pEVp27, amb lipofectamina. A les 24h s'han recollit i s'ha extret el RNA que s'ha retrotranscrit a cDNA per a la seu posterior anàlisis de RT-PCR. L'expressió gènica és veu augmentada en aquests gens. **(B)** Igual que en A però s'ha analitzat l'expressió del tràscrit immadur (pre-mRNA) en aquests gens, també s'observa un augment. Els gràfics representen les mitjanes ± SEM per cada gen de 4 experiments independents, utilitzant t-student ($p<0.05$), dades normalitzades al control pEVØ = 1.

La sobrexpressió de PCAF efectivament produeix l'efecte contrari al seu silenciament. Al silenciar PCAF hem vist que la transcripció d'aquests gens està disminuïda. Ara veiem que al sobrexpressar PCAF, la transcripció es veu augmentada en la majoria dels gens amb l'excepció de IGF1R i en menor grau SPAG9 (**Figura 43 A i B**). Aquest és el resultat de 4 experiments independents, la mitjana dels quals ens permet afirmar que la transcripció augmenta, però al utilitzar aquestes mitjanes perdem sensibilitat perquè, com passava al sobrexpressar p27, quan expressem PCAF el nivell de sobrexpressió aconseguit en cada experiment presenta una elevada la variabilitat. En la **Figura 44** veiem representats els nivells transcripcionals dels 4 experiments, de menys sobrexpressió de PCAF a més. Com més augmentada es troba PCAF més augmenten l'expressió dels 4 gens representats. Aquest augment de PCAF és inversament proporcional a la disminució de l'expressió de p27. Contràriament al que veiem quan silenciem PCAF, on l'expressió de p27 està augmentada.

En resum, donem més fiabilitat als resultats obtinguts en les cèl·lules shp27 i shPCAF que en els obtinguts en la sobrexpressió de les proteïnes. Ja que el silenciament permet una major homogeneïtat entre les cèl·lules, que es tradueix en una menor variabilitat en els resultats dels experiments independents.

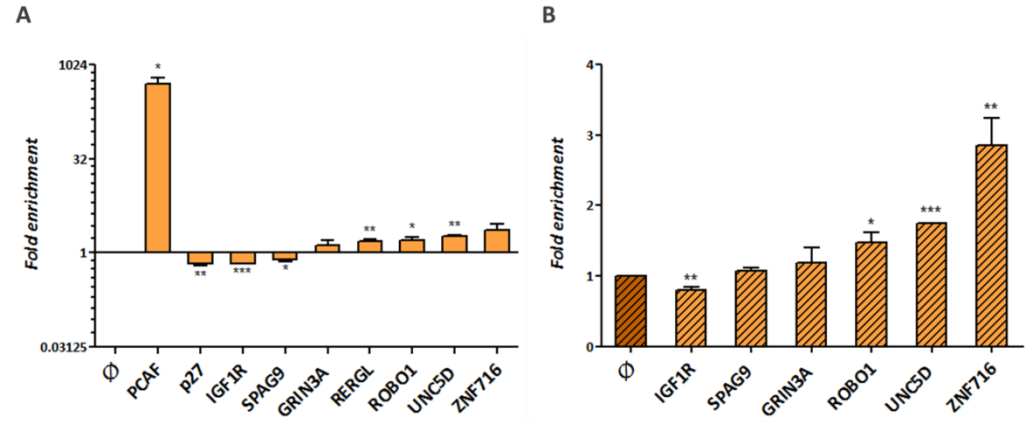


Figura 43. Nivells d'expressió gènica al sobrexpressar PCAF. (A) Cèl·lules HCT116 transfectades amb pEVØ o pEVPCAF, amb lipofectamina. A les 24h s'han recollit i s'ha extret el mRNA que s'ha retrotranscrit a cDNA per a la seu posterior anàlisi de RT-PCR. L'expressió gènica és veu augmentada en la majoria d'aquests gens. **(B)** Igual que en A però s'han analitzat l'expressió del trànscrit immadur (pre-mRNA) en aquests gens, i també s'observa un augment. Els gràfics representen les mitjanes ± SEM per cada gen de 4 experiments independents, utilitzant t-student ($p<0.05$), dades normalitzades al control pEVØ=1. En A escala log2.

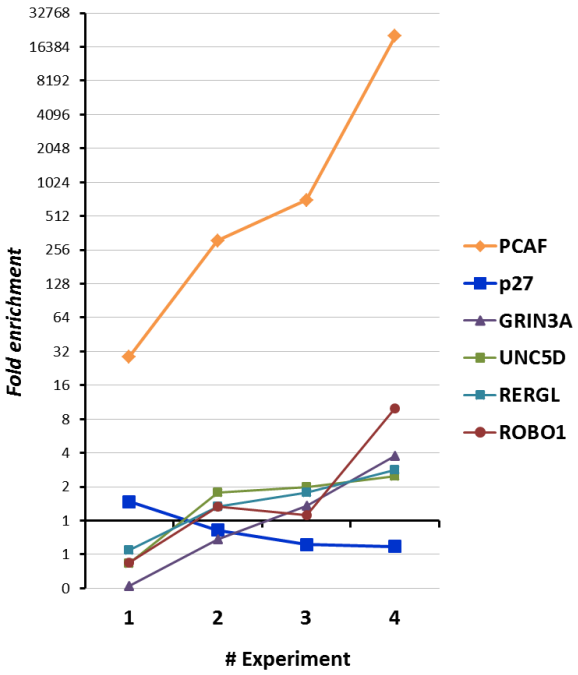


Figura 44. Representació gràfica dels nivells d'expressió gènica al sobrexpressar PCAF. Es representa l'expressió gènica d'aquests gens en els 4 experiments indep. ordenats de menor a major sobrexpressió de PCAF assolida. Dades normalitzades al control pEVØ=1. Escala log2.

- **Expressió gènica en cèl·lules HCT116 doble kd de p27 i PCAF**

Sabent l'efecte invers que p27 i PCAF juguen en la regulació transcripcional dels seus gens comuns, hem volgut determinar l'efecte que tindria el silenciament simultani de p27 i PCAF.

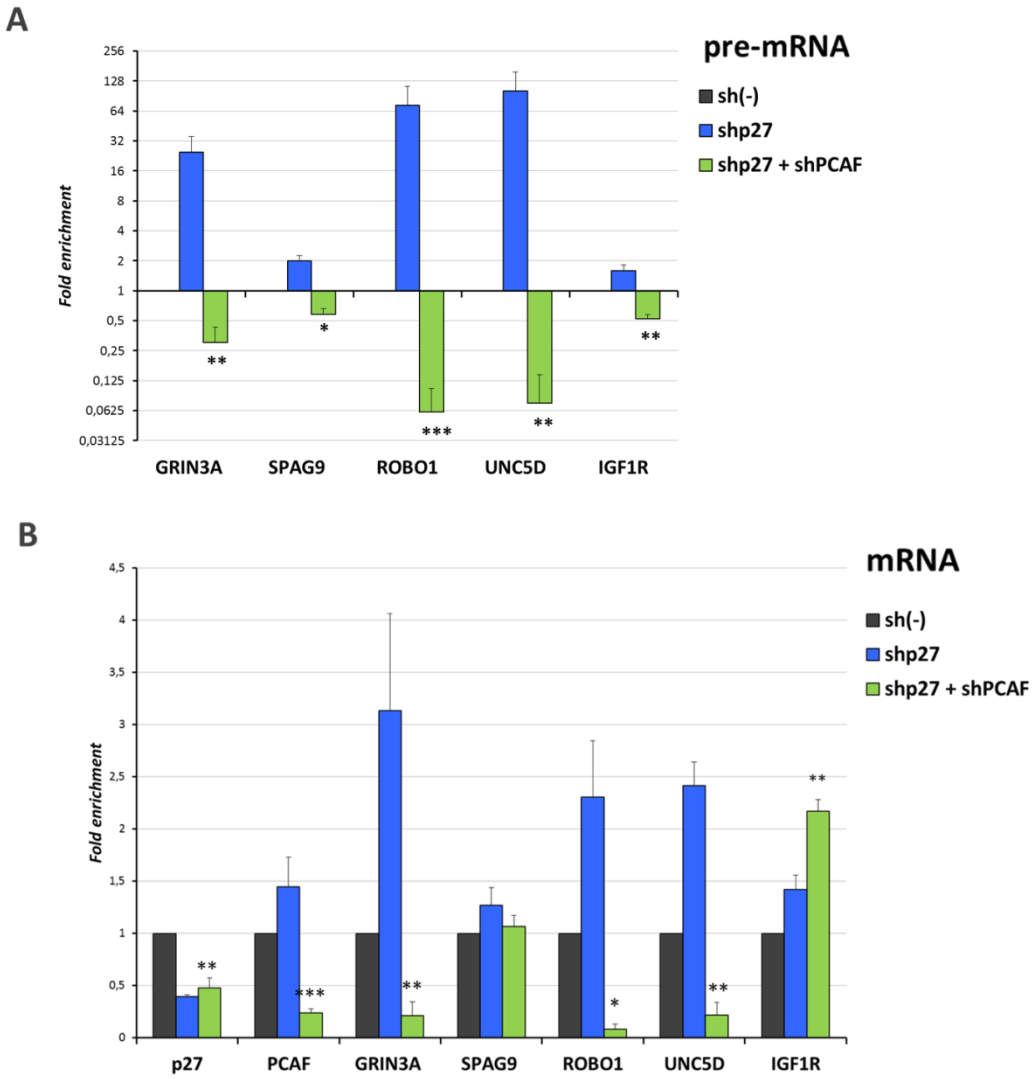


Figura 45. Nivells d'expressió gènica en cèl·lules doble kd de p27 i PCAF. (A) Cèl·lules HCT116 són silenciades amb sh(-) o shp27 o shp27 i shPCAF. S'ha extret el RNA i s'ha retrotranscrit a cDNA per a la seu posterior anàlisi de RT-PCR. L'expressió del pre-mRNA en aquests gens és veu disminuïda en cèl·lules doble kd. **(B)** Igual que en A però s'ha analitzat l'expressió del mRNA en aquests gens, i també s'observa una disminució en les cèl·lules doble kd. Els gràfics representen les mitjanes ± SEM per cada gen de 4 experiments independents, utilitzant t-student ($p<0.05$), dades normalitzades al control sh(-) = 1. En A escala log2.

Quan comparem cèl·lules doble kd amb cèl·lules shp27 veiem que no només recuperen l'estat de les cèl·lules control (sh(-)) sinó que la transcripció en aquestes cèl·lules està disminuïda (**Figura 45**). Aquest resultat és molt clar a nivell del pre-mRNA (**Figura 45A**), on l'expressió d'aquests gens es veu disminuïda de forma important. Observant l'expressió del mRNA madur d'aquests gens veiem que també es troba disminuïda en tots els gens excepte en el IGF1R (**Figura 45B**). Això pot ser degut a mecanismes d'estabilitat del mRNA.

Podem concloure que, en el doble kd de p27 i PCAF preval la regulació transcripcional de PCAF per sobre la regulació duta a terme per p27.

- Anàlisi funcional de les seqüències d'unió a cromatina de p27 i PCAF

Un cop definit el paper de p27 i PCAF en la transcripció dels seus gens diana ens interessa definir la funció dels seus llocs d'unió a la cromatina (pics del ChIP-seq). Aquestes seqüències d'unió a cromatina de p27 i PCAF es trobem en general bastant allunyades del promotor, però al analitzar-les amb el *Genome Browser* solen trobar-se en zones amb múltiples marcadors d'histones d'activació gènica, en zones de possibles *enhancers* o circumdant aquestes zones.

Per aquesta raó hipotetitzem que aquestes seqüències poden funcionar com a *enhancers*. Amb la finalitat de perseguir aquest objectiu hem fet assaigs luciferasa. Com les seqüències no es troben en el promotor dels gens d'interès, i per tant creiem que no siguin suficients per a produir un efecte en la transcripció per si sols, ja que creiem que es tracten més aviat de seqüències reguladores, hem utilitzat un vector d'expressió (pGL3) que porta un promotor actiu incorporat (SV40) i el gen luciferasa. En aquest vector hi hem clonat les seqüències d'unió a p27 o PCAF (recordem que no s'uneixen a les mateixes zones del DNA) per dos dels gens analitzats fins ara: GRIN3A i ROBO1.

Al silenciar p27 i transfectar les regions 'reguladores' observem un increment en la transcripció d'aquests gens (**Figura 46A**). Ens trobem que el vector buit (pGLØ), amb el promotor actiu presenta molta activitat luciferasa basal, i en les cèl·lules control (sh(-)) en que hi hem transfectat les regions 'reguladores' ja observem un lleu increment de la transcripció, encara que no és significatiu. Tot i això, el que és clarament significatiu és l'increment en la transcripció que pateixen les cèl·lules shp27 al expressar les regions reguladores respecte a les shp27 que expressen el vector buit (pGLØ).

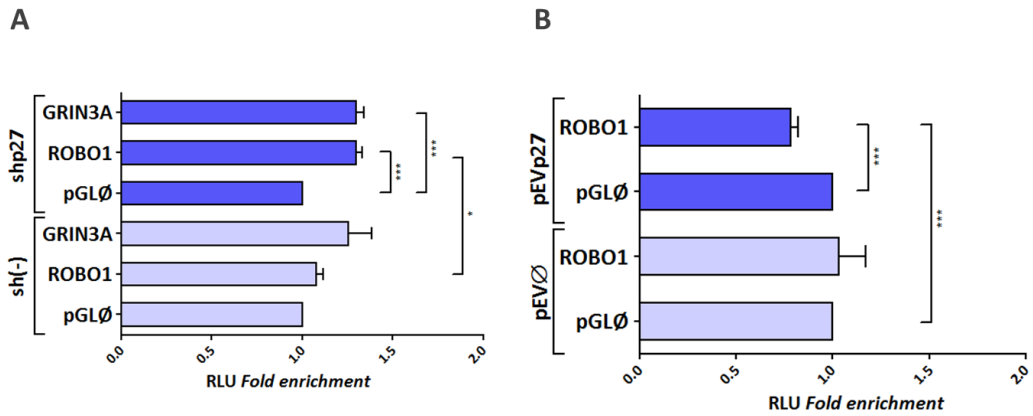


Figura 46. Assaig luciferasa en cèl·lules kd o sobrexpressant p27. Cèl·lules HCT116 són silenciades amb sh(-) o shp27 per infecció o transfectades amb pEVØ o pEVp27 amb lipofectamina, posteriorment són transfectades amb pGLØ, pGL-ROBO1 o pGL-GRIN3A amb lipofectamina. A les 24h es recullen i es mesura l'activitat luciferasa i galactosidasa. L'activitat luciferasa es normalitza per l'activitat galactosidasa (RLU, *relative luciferase units*) que després es normalitza pel seu respectiu control (sh(-)/shp27 o pEVØ/pEVp27 + pGLØ =1). Els gràfics representen les mitjanes ± SEM per cada condició, utilitzant t-student ($p<0.05$), de 3 experiments independents. **(A)** L'expressió gènica és veu augmentada quan s'expressen aquestes regions en shp27. **(B)** L'expressió gènica disminueix quan s'expressa la regió de ROBO1 i p27 conjuntament.

Hem dut a terme aquests assaigs luciferasa en cèl·lules que sobrexpressen p27. Observem una disminució en la transcripció quan s'expressa la regió de ROBO1 (**Figura 46B**). Per GRIN3A no observem canvis significatius, degut a l'elevada variabilitat inter-experimental que presenten aquestes cèl·lules.

Podem concloure doncs que aquestes regions del DNA d'unió a p27 són regions reguladores de la transcripció. Quan no hi ha p27 l'expressió dels gens s'incrementa. Per contra, quan sobrexpressem p27, l'expressió disminueix. Aquest resultat consolida la definició de p27 com a repressor transcripcional.

En cèl·lules kd de PCAF hem expressat la regió d'unió a PCAF en el gen GRIN3A en el vector luciferasa. En la **Figura 47A** veiem una disminució quan expressem aquesta regió 'reguladora' de GRIN3A en cèl·lules control (sh(-)) i en shPCAF. En aquestes últimes la disminució és més accentuada. Sent aquesta disminució entre el kd de PCAF que expressa la regió, significativa respecte les cèl·lules control que expressen la regió.

Per disminuir la variabilitat inter-experimental en la sobrexpressió de PCAF utilitzem el mutant Ct PCAF, que conté la regió C-terminal de PCAF, incloent el seu domini acetiltransferasa (HAT). Observem que al sobrexpressar aquest mutant

es reverteix la disminució que la regió 'reguladora' GRIN3A provoca en l'expressió gènica (**Figura 47B**).

Aquests resultats indiquen que la regió a la que s'uneix PCAF del gen GRIN3A és una zona reguladora de la transcripció. Com menys PCAF menys transcripció del gen hi ha, només sobrexpressant PCAF es contraresta l'acció inhibidora d'aquesta regió reguladora.

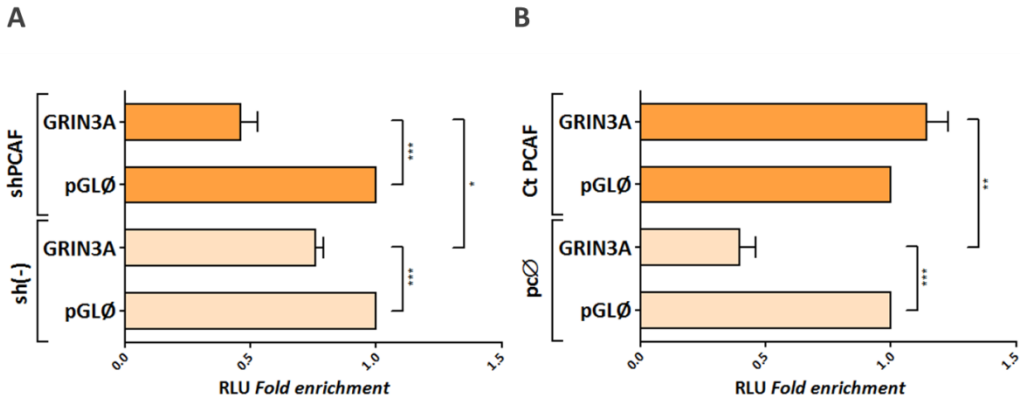


Figura 47. Assaig luciferasa en cèl·lules kd o sobrexpressant shPCAF. Cèl·lules HCT116 són silenciades amb sh(-) o shPCAF per infecció o transfectades amb pcØ o Ct PCAF amb lipofectamina, posteriorment són transfectades amb pGLØ o GRIN3A amb lipofectamina. A les 24h es recullen i es mesura l'activitat luciferasa i galactosidasa. L'activitat luciferasa es normalitza per l'activitat galactosidasa (RLU, *relative luciferase units*) que després es normalitza pel seu respectiu control (sh(-)/shPCAF o pcØ /Ct PCAF + pGLØ =1). Els gràfics representen les mitjanes ± SEM per cada condició, utilitzant t-student ($p<0.05$), de 2 experiments independents. **(A)** L'expressió gènica disminueix quan s'expressa la regió de GRIN3A en sh(-) i shPCAF. **(B)** L'expressió gènica augmenta quan s'expressa la regió de GRIN3A conjuntament amb PCAF.

- **Estudi dels motius d'unió a Factors de Transcripció dels pics d'interacció amb la cromatina de p27 i PCAF**

Tornant a les dades dels ChIP-seq, fem l'anàlisi *in silico* dels llocs d'unió a factors de transcripció (TFBS, *transcription factor binding site*) de les seqüències de DNA dels nostres 14 gens diana escollits. Descobrim que per PCAF, les famílies de factors de transcripció més representades (les trobem com a mínim al 40% dels 14 gens) són de més a menys: HOX, PAX, HNF, IRF, CEBP i FOXO. Per p27, seguint el mateix criteri de classificació tenim les famílies de: PAX, E2F, HNF i HOX. Com

podem observar, en primer lloc apareix la família PAX, recordem que PAX5 era el factor de transcripció més enriquit en l'anàlisi de totes les regions significatives del ChIP-seq de p27. En segona posició trobem la família dels E2Fs, en perfecta harmonia amb les publicacions anteriors a aquest treball, que descriuen la interacció de p27 amb el complex p130/E2F4 (Li et al. 2012; Pippa et al. 2012) .

Per tal de demostrar si PAX interacciona amb p27 en aquestes cèl·lules hem realitzat immunoprecipitacions. Efectivament, quan immunoprecipitem PAX veiem que interacciona amb p27. També s'observa interacció de PAX amb PCAF. Quan realitzem la co-immunoprecipitació contrària, immunoprecipitant p27 o PCAF, aquesta interacció no s'observa, possiblement degut a problemes de reconeixement dels complexes per part dels anticossos. En aquests experiments reafirmem la interacció p27/PCAF i p27/E2F4 (**Figura 48**).

Encara que PAX5 fos el membre de la família PAX més enriquit en l'anàlisi de TFBS del ChIP-seq, a l'hora de fer l'anàlisi dels TFBS específicament en els gens diana escollits, veiem que apareixen també PAX1, 2, 4, 7 i 9. Això pot ser degut a l' homologia dels dominis d'unió al DNA entre els diferents membres de la família. Per aquesta raó ens hem decantat per utilitzar un anticòs capaç de reconèixer tots els membres de la família PAX. Com que només es veu una única banda per sobre de 45kDa sembla que es tractaria d'una única proteïna. Cal esbrinar de quin membre de la família PAX es tracta per acabar d'afinar el model.

Podem concloure doncs que l'inhibidor de ciclines-CDKs p27 i l'acetiltransferasa PCAF interaccionen amb la família de factors de transcripció PAX en cèl·lules de càncer de còlon.

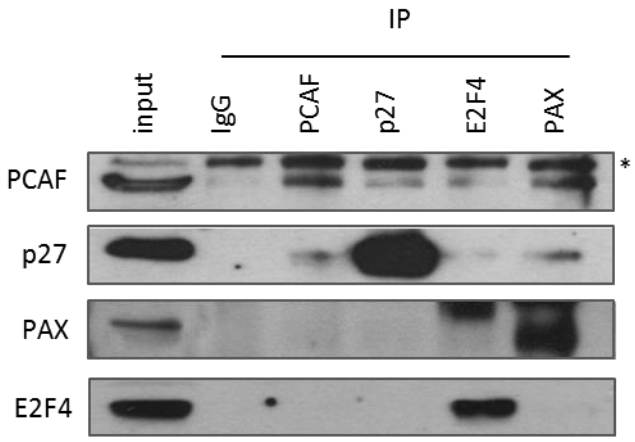
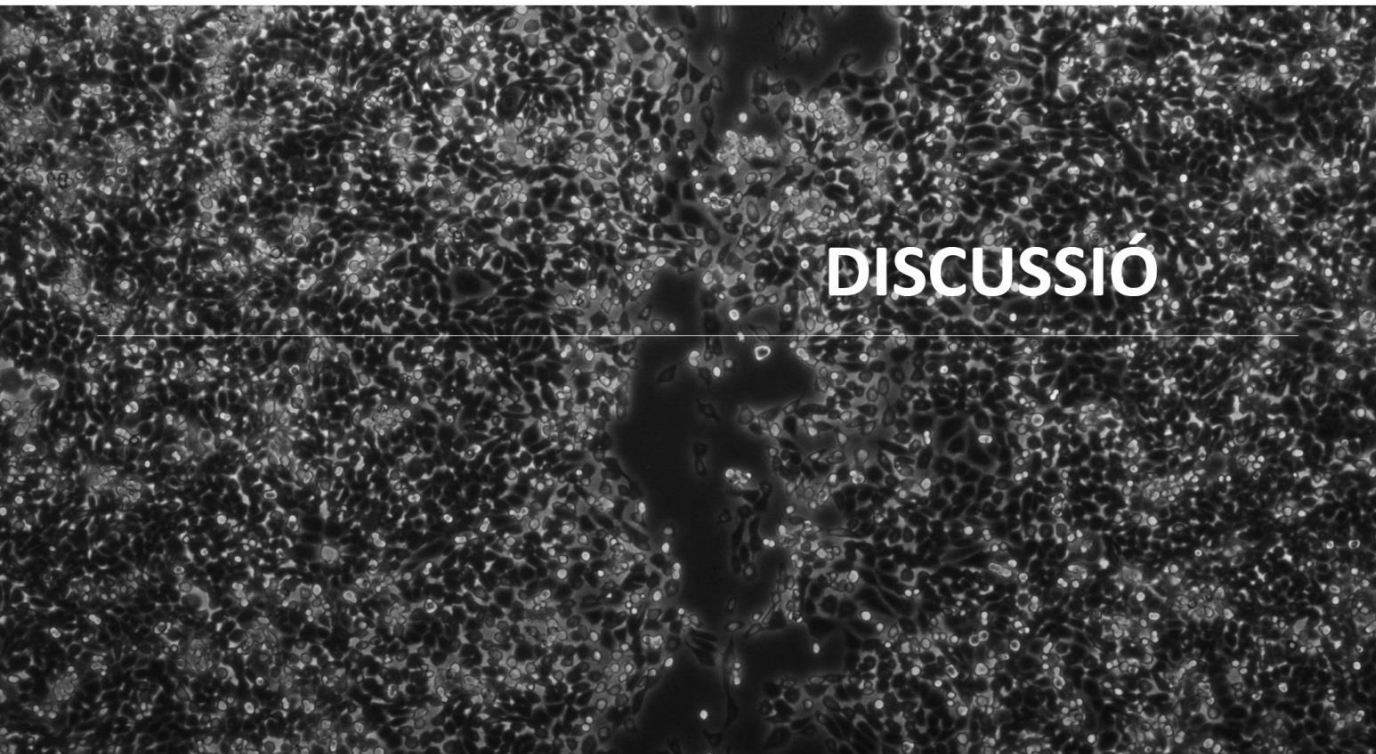


Figura 48. p27 co-immunoprecipita amb PAX. Cèl·lules HCT116 són processades per a IP amb els anticossos: anti-IgG, anti-PCAF, anti-p27, anti-E2F4 i anti-PAX. Un 10% de la mostra és separada per a ser utilitzada com a input. Posteriorment es va dur a terme un WB anti-PCAF, anti-p27, anti-E2F4 i anti-PAX. * banda inespecífica.



DISCUSSIÓ

L'inhibidor de ciclines-CDKs p27 és una proteïna imprescindible per a una correcta regulació del cicle cel·lular. Recentment, s'ha anat demostrant que independentment de la seva funció com a regulador de l'activitat de les CDKs, p27 també està implicada en altres processos primordials per a la cèl·lula, com són: la motilitat cel·lular, la transcripció, la diferenciació, la respiració, la senescència i l'apoptosi. Durant molt de temps s'ha assumit que p27 realitza les funcions dependents de CDKs en el nucli cel·lular i que estan associades al domini KID del extrem amino de la proteïna. Per contra, les funcions independents a la regulació de la proliferació per interacció amb les CDKs, estan relacionades amb el seu extrem carboxil i les duu a terme quan interacciona amb diferents proteïnes en el citoplasma. Per tant, les funcions de p27 depenen de la seva localització. En el càncer s'ha vist que els tumors que presenten una elevada presència de p27 en el citoplasma correlacionen amb un mal pronòstic. Aquesta correlació també es dóna en tumors que presenten uns nivells baixos de p27. Aquests nivells baixos normalment són deguts a modificacions post-traduccionals que provoquen un increment en la degradació proteasomal de p27 (Chu, Hengst, & Slingerland, 2008).

Davant l'evidència de les nombroses funcions de p27 i la seva importància en el càncer, el nostre grup d'investigació s'ha centrat en l'estudi de les noves funcions de p27. Basant-se en estudis proteòmics, s'han identificat proteïnes d'unió a p27 implicades en diversos processos biològics com la transcripció, la traducció, el processament de pre-mRNAs i la respiració cel·lular. Dins d'aquest grup de proteïnes trobem l'acetiltransferasa PCAF (*p300/CBP associated factor*), responsable de la regulació de diversos processos biològics a partir de l'acetilació de proteïnes. PCAF regula l'expressió gènica al acetilar histones, factors de transcripció i altres proteïnes nuclears i citoplasmàtiques. L'acetilació de proteïnes pot provocar canvis en l'afinitat entre el DNA i la proteïna, entre aquesta i altres proteïnes o pot provocar un canvi en la seva localització (Nagy & Tora, 2007).

Estudis previs en el nostre laboratori descriuen la interacció *in vitro* de PCAF amb la regió PID (*PCAF-Interacting Domain*, aa91-120) de p27 i demostren que aquesta interacció condueix a l'acetilacio de p27 en la lisina 100 per part de PCAF. En aquesta Tesi el nostre objectiu ha sigut el de caracteritzar i definir la funció de la interacció entre aquestes dues proteïnes.

Primer de tot, vam confirmar la col·localització en el nucli de les dues proteïnes i la seva co-immunoprecipitació en diversos models cel·lulars (**Figures 10 i 15**). Això és important ja que ens indica que es tracta d'una interacció conservada entre diferents espècies de mamífers i en teixits que es troben en diversos estats proliferatius (ex: MEFs i HCT116).

A continuació, vam estudiar l'estat d'acetilació de p27. Sabíem, a partir d'assajos d'acetilació *in vitro* de pèptids de p27, que PCAF podia acetilar les lisines 25, 96 i 100 de p27. No obstant, vam identificar que emprant la proteïna p27 sencera, PCAF solament acetilava la K100 *in vitro*. En aquesta Tesi hem identificat la lisina 100 com el residu específic d'acetilació *in vivo*, ja que la p27 amb la lisina 100 mutada a arginina no s'acetila (**Figura 11**). Aquesta informació és interessant ja que, fins a l'actualitat, només s'han descrit modificacions post-traduccionals de fosforilació en residus tirosina i treonina de p27. En residus lisina només s'havien descrit les ubiqüitinitzacions que es donen en els processos de degradació de la proteïna. Com se sap la repercussió que tenen les fosforilacions en l'estabilitat i la localitzacions de les proteïnes, vam voler saber si l'acetilació tindria un efecte similar.

Per això vam estudiar la localització del mutant p27K100R en el transcurs del cicle cel·lular (de G0 al final de G1). Vam constatar que mentre que la p27wt transloca del nucli al citoplasma durant aquest període de temps, pel contrari, aquest mutant, és retingut al nucli (**Figura 12**). Paral·lelament, els nivells de proteïna indiquen que, efectivament, aquest mutant, a diferència de p27wt, no s'està degradant al final de la G1 (**Figura 13**). Aquests resultats ens indiquen que l'acetilació en el residu K100 de p27 és necessària per a la seva translocació del nucli al citoplasma durant la G1, on es degradarà via proteasoma.

Per altra banda, quan variem els nivells de proteïna de PCAF veiem que s'afecten els nivells de la proteïna p27. Quan sobrexpressem PCAF, la p27 endògena disminueix (Pérez-Luna et al., 2012) i en canvi, en el kd de PCAF trobem la p27 augmentada (**Figura 36 i 40**). Aquestes dades reforcen la idea de que PCAF influeix en l'estabilitat de la proteïna p27.

Observant l'acetilació de p27 al llarg del cicle cel·lular, observem sempre uns nivells basals de p27 acetilada, que podria significar un recanvi basal de la proteïna en el nucli. A les 2 hores després de l'inici de la fase G1 veiem un pic d'acetilació (**Figura 14**). Aquest pic de màxima acetilació de p27 coincideix amb el moment previ a la sortida de p27 al citoplasma i de la seva degradació.

Fins aquest moment, s'havia descrit que p27 és degradada en el citoplasma durant la G1, després de ser ubiqüitinitzada pel complex KPC (Kamura et al., 2004). Els autors demostren que el domini aa42-102 de p27 és necessari per a la seva ubiqüitinització per KPC (Kotoshiba et al., 2005). No obstant, no es coneixia el senyal que indueix la seva sortida del nucli en la transició G0/G1. S'ha hipotetitzat

que la fosforilació en la serina 10 de p27 podria ser aquest senyal, però els resultats de diferents treballs no ho han pogut confirmar (Starostina & Kipreos, 2012).

A partir de les dades del nostre treball proposem que l'acetilació de p27 en la K100 és un nou mecanisme que regula la seva translocació del nucli al citoplasma, en la transició G0/G1. A més, també demostrem que el domini PID (*PCAF-Interacting Domain*, aa91-120) de p27 estaria implicat en l'estabilitat de la proteïna.

És interessant el fet que dins el PID trobem un PRD (*Proline Rich Domain*), una regió que interacciona amb alta afinitat amb els dominis estructurals SH3 (*Src Homology 3*). Les tirosina quinases de la família Src (ex: c-Src, Bcr-Abl, Lyn) contenen dominis SH3 pels quals interaccionarien amb el PRD de p27. Aquestes quinases estan implicades en la degradació de p27 durant la transició G1/S, ja que interaccionen amb ella i fosforilen els residus Y74, Y88 i Y89, facilitant la posterior fosforilació en la T187 i la seva posterior degradació.

Aquesta informació ens permet afirmar que el domini PID de p27 juga un paper important en la regulació de la seva estabilitat: per una banda uneix PCAF i conté el residu acetilable en la transició G0/G1 i per altra banda uneix a les tirosina quinases responsables de la seva degradació durant la transició G1/S.

Un cop determinat el mecanisme que provocava l'acetilació de p27 i la implicació d'aquest mecanisme en la seva estabilitat, el nostre segon objectiu era el de determinar si la interacció amb PCAF estava relacionada amb la recentment descoberta funció de p27 en la regulació transcripcional dels seus gens diana (Li et al., 2012; Pippa et al., 2012).

Valent-nos d'una innovadora tècnica *High-throughput*, el ChIP-seq, vam definir els llocs d'unió de p27 a la cromatina. Els resultats ens indiquen que p27 s'uneix sobretot a regions distals intergèniques (**Figura 20**), es tracta d'una informació innovadora ja que fins ara només teníem dades de la seva unió als promotors (ChIP-on-chip). Aquesta dada ens dóna noves idees sobre el paper que desenvolupa p27 en la transcripció, unint-se a zones allunyades de les 'unitats de transcripció'.

Varis estudis recents expliquen la importància de la regulació gènica de llarga distància (*long-range*), duta a terme per múltiples elements genòmics *cis* distals, que controlen la correcta expressió espacial-temporal del gen (Dekker, 2008; Kleinjan & van Heyningen, 2005; West & Fraser, 2005). Normalment es defineixen com a *enhancers*, però també poden ser *repressors* o *insulators*. Aquests elements reguladors de llarga distància es troben en les regions genòmiques fins a 1Mb al voltant de la

'unitat de transcripció'. Molts d'aquests elements reguladors es troben dins d'introns de gens que normalment presenten una funció que no té cap relació amb la del gen regulat. L'aproximació d'aquests elements distals als promotors es dóna pel cada cop més acceptat mecanisme d'ondulació del DNA (*DNA-looping*) (Maston, Evans, & Green, 2006). Fins hi tot, s'han descrit casos de regulació gènica per mitjà d'elements reguladors localitzats en cromosomes diferents. És per això que en aquesta Tesi hem volgut aprofundir en l'estudi de l'efecte regulador d'aquestes regions d'unió a p27 en l'expressió gènica.

Per altra banda, el ChIP-seq de PCAF ens confirma la seva preferència per a unir-se a les regions exòniques dels gens (**Figura 20**). La trobem enriquida en els promotors però sobretot en els exons, dada que coincideix amb el ChIP-seq realitzat en cèl·lules T quiescents, en que PCAF a diferència de p300 i CBP, què es troben enriquides només en els promotors de gens actius, també es troba enriquida al llarg del cos del gen (Wang et al., 2009). Aquest fet lligaria amb la seva implicació en l'elongació de la transcripció (Cho et al., 1998). Cal afegir que PCAF també correlaciona amb les zones intergèniques sensibles a la DNAsa I HS (*DNAse I hypersensitive sites*), suggerint la seva implicació en *enhancers*. Concluim que l'acetiltransferasa PCAF presenta un patró d'unió al DNA que difereix del d'altres acetiltransferases i també del de p27.

El fet que trobem que la unió de p27 i PCAF a la cromatina estigui específicament enriquida en determinats cromosomes ens indica l'especificitat de la seva funció reguladora (**Figure 21**).

Un altre aspecte interessant del ChIP-seq de p27 és el fet que trobem la p27 sobretot unida a zones pertanyents a pseudogens i RNAs no codificants (**Figura 23**).

La investigació sobre els RNAs no codificants (ncRNAs) ha aportat suficients evidències per a considerar la regulació realitzada per RNAs, com un altre nivell en la regulació transcripcional dels eucariotes superiors, i alguns ncRNAs s'han associat a malalties humanes (Mattick, 2004). Així doncs, encara queda molt per descobrir sobre la regulació per RNAs, i les nostres dades suggereixen que p27 hi podria estar involucrada.

Els pseudogens, gens no funcionals i homòlegs a gens funcionals, són definits mitjançant complexos algoritmes i han estat considerats durant molt temps com trànscrits biològicament inactius. En alguns casos però, se'ls hi està atribuint funcions en la regulació de la transcripció ja que poden ser transcrits a RNA i actuar de 'reclam' pels microRNA (Poliseno et al., 2010; Suo et al., 2005). S'ha vist

que alguns presenten un patró d'activació específic de teixit (Pink et al., 2011). Per tant, seria interessant aprofundir en els pseudogens potencialment regulats per p27 ja que podrien jugar un paper funcional desconegut fins ara.

Sorprenentment, al agrupar funcionalment els gens d'unió a cromatina de p27, trobem molt enriquida la funció d'adhesió cel·lular, la diferenciació neuronal i la senyalització cel·lular (**Figura 24**). En canvi, no observem que hi hagi unió de p27 a prop de gens relacionats específicament amb el cicle cel·lular. Aquest resultats suggereixen que p27 participa en la regulació de diverses funcions cel·lulars, fins ara impensades, a través de la regulació de la transcripció de gens implicats en aquestes funcions.

De fet, els grups funcionals enriquits estan tots relacionats amb el desenvolupament i la diferenciació cel·lular (l'adhesió i la senyalització cel·lular són funcions primordials durant el desenvolupament i la diferenciació). Ens sorprèn que apareguin molts grups funcionals relacionats amb la neurogènesi, sobretot quan els experiments s'han dut a terme en cèl·lules tumorals de còlon. Per això, en l'elecció dels gens comuns de p27 i PCAF hem escollit alguns relacionats amb el sistema nerviós, com són ROBO1 i UNC5D (dos receptors involucrats en la navegació axonal). El següent pas en la investigació seria estudiar l'efecte que té la regulació per p27 sobre aquests gens en cèl·lules mare neurals. De fet, la investigació de l'equip del Dr. Serrano ha descrit la repressió transcripcional que provoca p27 sobre el gen Sox2 en cèl·lules mare pluripotents (iPSCs) (Li et al., 2012). Aquest gen forma part de la família SOX (*SRY-related HMG-box*) uns factors de transcripció involucrats en la regulació del desenvolupament embrional i la determinació del destí cel·lular. És interessant l'observació que en les nostres cèl·lules hem vist unió de p27 (300 kb *downstream*) al gen de Sox5, un membre d'aquesta família implicat en la condrogènesi i la miogènesi (Smits, Dy, Mitra, & Lefebvre, 2004).

En l'agrupació funcional dels gens potencialment regulats per PCAF, cal comentar la diferència entre els gens on PCAF s'uneix al cos del gen (intragènica) i els gens on PCAF s'uneix fora dels gens (intergènica) (**Figura 25**). En el primer grup, les funcions més enriquides coincideixen amb les de p27. En el segon, a part d'aquestes funcions també trobem molt enriquida la funció de regulació de la transcripció. És a dir que un grup important de gens, amb unió a PCAF en regions distals, estan implicats en la transcripció.

Quan analitzem els gens amb unió a cromatina de PCAF en trobem diversos involucrats en la transcripció, per exemple, PCAF s'uneix sobre el gen ERCC6

(CBS) (*inside* i sobre el promotor d'una isoforma més curta), un remodelador de la cromatina ATP-dependent en el complex de la RNA polimerasa. S'ha descrit que la proteïna ERCC6 recluta a PCAF en els promotors del rDNA, això permetrà l'acetilació d'histones requerida per a la unió del complex de la RNA Polimerasa I a l'inici de la transcripció, provocant la transició d'un estat *poised* de la cromatina a un estat actiu (Shen et al., 2013), el que no se sabíem fins ara és que PCAF està unit a nivell de cromatina al gen de ERCC6. Fet que ens portaria a hipotetitzar una regulació transcripcional d'ERCC6 mitjançada PCAF.

S'ha definit a PCAF com un inhibidor de la progressió del cicle cel·lular, quan es troba disminuïda dóna una mitosis aberrant (Ha et al., 2009). A més, interacciona i inhibeix l'activitat de CDK2 provocant una parada del cicle cel·lular en la fase G2/M (Mateo et al., 2009). En els nostres resultats del ChIP-seq, trobem unió de PCAF al gen CDKN3, CDKN3 és una proteïna inhibidora de ciclines-CDKs que desfosforila CDK2 prevenint-ne la seva activació. Com PCAF s'uneix al voltant del gen de CDKN3, valdria la pena comprovar si PCAF a banda d'acetilar la proteïna CDK2 també està controlant els seus nivells al regular la transcripció del seu inhibidor CDKN3.

També relacionat amb el cicle cel·lular trobem que PCAF s'uneix a la cromatina dels gens: p57, CDK9 i interessantment a les ciclina D1 (CCND1) i ciclina D3 (CCND3), en aquest últim la interacció es dóna sobre el promotor.

PCAF contraresta l'activitat mitogènica de l'oncoproteina adenoviral E1A (Reid, Bannister, Zegerman, Martínez-Balbás, & Kouzarides, 1998; Yang, Ogryzko, Nishikawa, Howard, & Nakatani, 1996) i en el nostre ChIP-seq observem la unió de PCAF a ZMYND11 (BRAM1, BS69), aquesta proteïna reprimeix la transactivació de la proteïna viral E1A al interaccionar-hi i també està implicada en la senescència cel·lular a través de la via p53-p21 (Hateboer et al., 1995; W. Zhang, Chan, Gao, Poon, & Wu, 2007).

PCAF a part d'interaccionar i d'acetilar, junt amb p300/CBP, a MyoD facilitant la diferenciació miogènica (Puri et al., 1997; Sartorelli et al., 1999), també participa en la transcripció diferencial dels gens regulats per MyoD (Dilworth, Seaver, Fishburn, Htet, & Tapscott, 2004). En el ChIP-seq veiem unió de PCAF a unes 10kb *upstream* del gen de MyoD.

També trobem PCAF unida a la cromatina sobre gens que codifiquen pels factors de transcripció de la família Smad, concretament s'uneix a Smad2, 6 i 7. Recordem que s'ha descrit que PCAF potencia la senyalització duta a terme per TGFβ/Smad al unint-se a Smad3 (Itoh, Ericsson, Nishikawa, Heldin, & ten Dijke, 2000).

Així mateix, veiem unió de PCAF sobre alguns gens de la família de factors de transcripció PAX: PAX2 (en el promotor i *inside*), 5 (*inside*), 7 (*inside*) i 9 (en promotor i *inside*). PAX2 s'ha relacionat amb una activació de la proliferació en cèl·lules de càncer de còlon (H.-S. Zhang et al., 2012).

Curiosament, p27, al igual que PCAF, la trobem unida al gen PAX9, a 100 kb *downstream*. Totes aquestes dades sobre els programes transcripcionals de p27 i PCAF en cèl·lules HCT116 són interessants per a tenir en compte en futurs experiments.

Quan solapem els gens del ChIP-seq p27 amb els de PCAF observem que la meitat són comuns, encara que p27 i PCAF no comparteixen la seva localització en la cromatina (**Figura 30**). Aquest resultat ens indica que les dues proteïnes estarien regulant els mateixos gens però per zones de regulació diferents. Per tant, es interessant remarcar que p27 regula la transcripció en col·laboració amb PCAF en un percentatge molt important dels seus gens diana (~50%).

Hem escollit un subgrup de 14 gens comuns per tal d'analitzar el paper que p27 i PCAF duen a terme en la seva expressió. En les cèl·lules kd de p27 l'expressió de la majoria d'aquests gens tendeix a estar incrementada (**Figura 37**). Aquest fet significa que p27 exerceix un efecte repressor en l'expressió d'aquests gens, conclusió que està en perfecte consonància amb resultats previs del nostre i d'altres grups (Li et al., 2012; Pippa et al., 2012).

Per contra, en els kd de PCAF, l'expressió d'aquests gens disminueix (**Figura 38**). PCAF doncs, provoca una activació en l'expressió que es perd al disminuir-ne la proteïna. Resultat en perfecta sintonia amb la definició de PCAF com a coactivador transcripcional (Nagy & Tora, 2007; Sterner & Berger, 2000).

A més, com indiquen els anàlisis realitzats per determinar directament la transcripció, es a dir, detectant els nivells del primer trànscrit d'aquests gens, la regulació duta a terme tant de p27 com de PCAF és dóna de forma directa en l'inici del procés transcripcional (**Figura 39**). Les proteïnes p27 i PCAF provoquen doncs, efectes antagònics en l'expressió dels seus gens diana. No tant sols en les cèl·lules HCT116, on s'ha dut a terme els ChIP-seqs, sinó que també veiem el mateix efecte en silenciar cèl·lules MCF-7, de càncer de mama (**Figura 40**). El fet que la regulació transcripcional mitjançant p27 i PCAF es doni en diferents models cel·lulars ens indica que no es tracta d'un mecanisme de regulació estrictament tissular (específic de teixit) sinó d'un sistema de regulació generalitzat.

Quan volem analitzar la situació contrària, sobrexpressant les proteïnes, ens trobem amb un problema de variabilitat entre mostres. En p27 no obtenim resultats estadísticament significatius però per PCAF si, i efectivament l'expressió de la majoria dels seus gens diana està incrementada, contràriament al que passava en silenciar-la (**Figures 42 i 43**).

Paral·lelament a l'anàlisi d'expressió dels gens diana en situacions de silenciament o sobrexpressió de PCAF, hem analitzat també els nivells de mRNA de p27. Quan silenciem PCAF els nivells de missatger de p27 augmenta, contràriament a la resposta dels gens diana que veuen disminuïda la seva expressió, i en el WB veiem que els nivells de proteïna de p27 en efecte, també augmenten (**Figures 36 i 38**). Per altra banda, al sobrexpressar PCAF, l'expressió de mRNA de p27 disminueix, i com més elevada és l'expressió de PCAF més disminueixen els nivells d'expressió de p27 (**Figura 43 i 44**). Aquests resultats ens diuen que PCAF regula negativament l'expressió de p27 a nivell transcripcional.

En el primer apartat d'aquesta Tesi hem descrit com l'acetilació duta a terme per PCAF afectava a l'estabilitat de la proteïna p27. Podem concloure que PCAF està regulant p27 a dos nivells: per una banda inhibint-ne la transcripció del mRNA, disminuint així la síntesi proteica *de novo* i per l'altra acetilant la proteïna existent provocant-ne la seva degradació.

És interessant fer referència als resultats obtinguts en kd de PCAF en cèl·lules de càncer de còlon, en aquest cas LovO, on es veu un increment en la diferenciació, una disminució en la migració i en la tumorogènesi (Ge, Jin, Zhang, Yan, & Zhai, 2009). En resum, el kd de PCAF té un efecte antitumoral. Nosaltres constatem en aquesta Tesi que el kd de PCAF en cèl·lules de còlon HCT116, manté l'expressió de gens pertanyents a diverses vies de senyalització disminuïda i l'expressió de p27 elevada.

Per altre banda, cal fer un incís per comentar que, en el kd de p27 trobem augmentats els nivells de mRNA de PCAF, al igual que trobem augmentats els nivells dels seus gens diana. Encara que en el ChIP-seq no aparegui unió de p27 sobre el gen KAT2B sembla que p27 està afectant la transcripció de PCAF d'alguna manera.

Per entendre la mecanística de la regulació antagònica duta a terme per p27 i PCAF sobre els seus gens diana vam produir cèl·lules kd dobles. Veiem que en aquestes cèl·lules l'expressió dels gens diana es troben disminuïts, es comporten com un kd de PCAF (**Figura 45**). Podem determinar que la funció d'activador transcripcional de PCAF preval sobre de la repressió duta a terme per p27.

Fins aquí, les dades obtingudes sobre l'acetilació de p27 i l'expressió dels gens diana comuns de p27 i PCAF en les cèl·lules kd, ens han permès formular el model de la **Figura 49**. En una situació sense p27 ni PCAF com en el doble kd, no hi hauria expressió del gen diana (**Figura 49A**). Veiem el mateix efecte repressor en la transcripció dels gens diana de p27 en cèl·lules quiescents, ja que aquestes cèl·lules tenen nivells elevats de p27. Tot i que ja es dóna la interacció entre PCAF i p27, l'efecte de la repressió de p27 sobre els seus gens diana en G0 és tangible. Aquesta situació mimetitzaria les cèl·lules kd de PCAF (**Figura 49B**). Al iniciar-se la fase G1, p27 assoleix uns nivells d'acetilació màxims i es translocada al citoplasma on serà degradada pel complex KPC (**Figura 49C**). Finalment doncs, sense p27, PCAF activaria la transcripció dels gens diana. Situació similar a la que provoquem en el kd de p27 (**Figura 49D**).

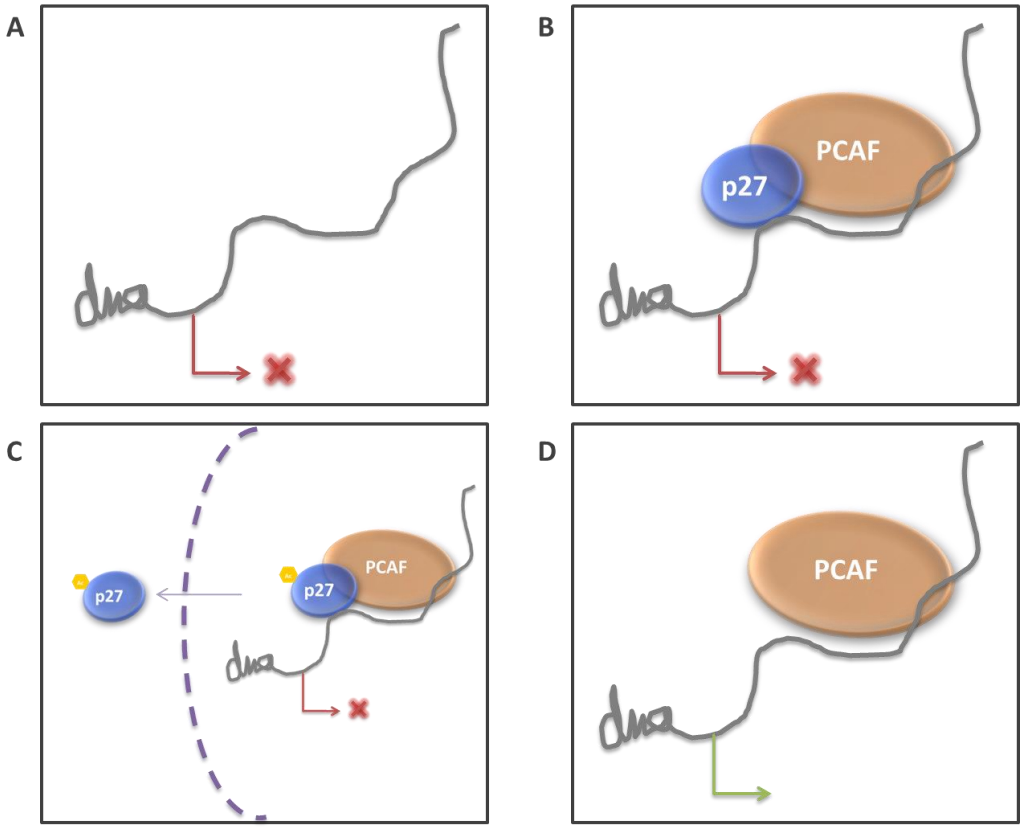


Figura 49. Model de la regulació transcripcional d'un gen diana de p27 i PCAF. (A) En absència p27 i PCAF no hi ha transcripció. **(B)** En fase G0 p27 reprimeix la transcripció. **(C)** A l'inici de la fase G1 la p27 acetilada surt al citoplasma on serà degradada via proteasoma. **(D)** En absència de p27, PCAF activa la transcripció.

Els resultats anteriors ens van portar a hipotetitzar que les regions d'unió al DNA de p27 i PCAF estan actuant d'elements reguladors (*enhancers, silencers*) de la transcripció. Per tal d'assolir aquest objectiu vam caracteritzar les regions del DNA d'unió a p27 o a PCAF dels gens diana ROBO1 i GRIN3A mitjançant assaigs luciferasa. Aquestes regions d'unió a p27 tenen propietats activadores. En absència de p27 aquestes regions augmenten l'expressió del gen luciferasa en aquests assajos (**Figura 46**). En canvi, quan augmenta p27 aquestes regions reguladores provoquen una disminució en l'expressió. Així doncs, p27 està reprimint aquests *enhancers* (**Figura 50A**). En el cas de la regió reguladora d'unió a PCAF en el gen GRIN3A ens trobem en el cas contrari, es tracta d'una regió repressora de la transcripció, ja que en absència de PCAF aquesta regió disminueix l'expressió del gen de la luciferasa, fins hi tot en cèl·lules control aquesta regió per si sola ja provoca una disminució de l'expressió. Al incrementar PCAF l'expressió de la luciferasa augmenta i encara ho fa més en presència d'aquesta regió (**Figura 47**). Així doncs, PCAF activa o desbloqueja aquest *silencer*, una seqüència que confereix un efecte negatiu (ex: silenciant o reprimint) sobre la transcripció del seu gen diana (**Figura 50B**).

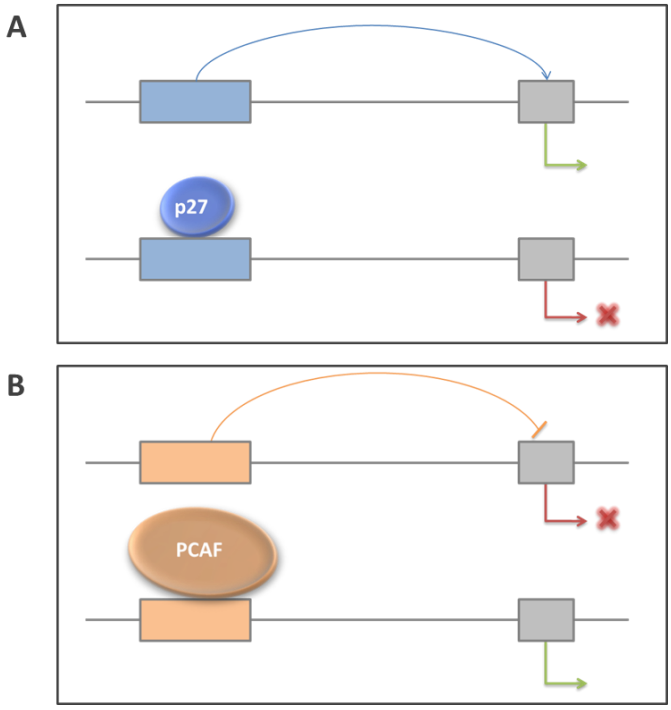


Figura 50. Model dels elements reguladors de la transcripció. (A) Els elements reguladors d'unió a p27 (blau) es comporten com a *enhancers*, quan s'hi uneix p27 la seva regulació queda suprimida. **(B)** Els elements reguladors d'unió a PCAF (taronja) es comporten com a *silencers*, quan s'hi uneix PCAF la seva regulació queda suprimida i s'activa la transcripció.

Arribem al final de d'aquesta Tesi discutint la interacció de p27 i PCAF amb PAX (**Figura 48**). La família de factors de transcripció PAX estan involucrats en el manteniment de la pluripotència i influeixen en la diferenciació de diferents llinatges cel·lulars. Aquesta propietat sumada a la seva funció proapoptótica, els relaciona directament amb la progressió del càncer (sobretot els components dels grups II i III) (Lang, Powell, Plummer, Young, & Ruggeri, 2007; Robson, He, & Eccles, 2006).

Aquests factors de transcripció involucrats en la diferenciació cel·lular encaixen amb un dels grups funcionals més enriquits que obtenim al analitzar l'ontologia gènica dels ChIP-seqs. L'anàlisi computacional dels factors de transcripció que potencialment es poden unir als pics de p27, ens descobreix que aquestes seqüències estan enriquides amb motius d'unió a PAX5, i al descriure la interacció *in vivo* entre p27 i PAX, que veiem mitjançant immunoprecipitacions, ens permet la presentació d'un nou model molecular de regulació transcripcional on participen p27 i PAX. Seria interesant aprofundir en la definició d'aquesta interacció i la seva funcionalitat.

Recentment, s'ha descrit com PAX2 indueix la proliferació en cèl·lules de càncer de còlon (entre elles la línia cel·lular HCT116) induint l'expressió de ciclina D1 mitjançant l'activació de AP-1 (Zhang et al., 2012). Descriuen com el kd de PAX2 provoca una parada del cicle cel·lular en G1, veuen una disminució en els nivells de ciclina D1 però no s'aprecien canvis en els nivells de p21, ciclina E1 i ciclina B1. No obstant, en aquest treball no estudien els nivells de p27. Veien els resultats d'aquesta Tesi seria interessant fer-ho.

Com a resum global d'aquesta Tesi, presentem un nou mecanisme pel qual p27 reprimiria l'expressió gènica unint-se a elements reguladors del DNA dels seus gens diana, i aquesta funció transcripcional es veuria contrarestada per PCAF, que per una banda promourà la degradació de p27 acetilant-la i per l'altra s'unirà a elements reguladors del DNA d'alguns gens diana de p27 (aproximadament del 50%), activant-ne la transcripció.

Al llarg de la Tesi hem fet múltiples referències a la implicació de p27, PCAF i finalment PAX en la tumorogènesi i per tant una millor comprensió del seu paper ens ofereix noves oportunitats per al desenvolupament de teràpies contra el càncer.

CONCLUSIONS

A. PCAF regula l'estabilitat de p27.

1. p27 i PCAF co-localitzen en el nucli.

2. p27 es acetilada en la K100 *in vivo*. Aquesta modificació en regula l'estabilitat.

3. L'acetilació de p27 presenta un pic a l'inici de la fase G1 del cicle cel·lular previ a la seva degradació.

4. p27 regula els nivells de PCAF ja que aquesta es troba disminuïda en MEFs p27KO.

B. p27 i PCAF es localitzen en regions diferents de la cromatina dels seus gens diana.

1. p27 s'uneix a la cromatina en regions distals de les unitats de transcripció.

2. PCAF s'uneix a la cromatina en regions exóniques dels gens.

3. p27 s'uneix significativament a potencials regions reguladores de pseudogèns i RNAs no codificants.

4. Els gens potencialment regulats per p27 estan involucrats en l'adhesió cel·lular, la diferenciació neuronal i la senyalització cel·lular.

5. Els gens potencialment regulats per PCAF estan involucrats en l'adhesió cel·lular, la diferenciació neuronal, la senyalització cel·lular i la transcripció.

6. Aproximadament el 50% de gens del ChIP-seq de p27 estan inclosos en al ChIP-seq de PCAF però p27 i PCAF no comparteixen la seva localització en la cromatina.

C. p27 i PCAF regulen de forma antagònica l'expressió dels seus gens diana.

1. p27 reprimeix i PCAF activa l'expressió de la majoria dels seus gens diana.

2. PCAF regula negativament la transcripció de p27.

3. En els dobles kd de p27 i PCAF l'expressió dels gens diana es troba disminuïda. La funció d'activador transcripcional de PCAF preval sobre de la repressió duta a terme per p27.

4. p27 i PCAF s'uneixen a elements reguladors de la transcripció. p27 s'uneix a elements amb efecte activador i PCAF s'uneix a elements amb efecte silenciador sobre el seu gen diana.

D. p27 i PCAF interaccionen amb PAX.

1. Els elements de DNA d'unió a p27 estan enriquits amb motius d'unió a PAX5.

2. p27 i PCAF interaccionen amb PAX en cèl·lules HCT116.

BIBLIOGRAFIA

Acosta, J.C. et al., 2008. Myc inhibits p27-induced erythroid differentiation of leukemia cells by repressing erythroid master genes without reversing p27-mediated cell cycle arrest. *Molecular and cellular biology*, 28(24), pp.7286–95.

Alberts, B. et al., 2002. Molecular Biology of the Cell.

Althammer, S. et al., 2011. Pyicos: a versatile toolkit for the analysis of high-throughput sequencing data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 27(24), pp.3333–40.

Ashburner, M. et al., 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics*, 25(1), pp.25–9.

Bailey, T.L. & Elkan, C., 1994. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proceedings / ... International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology ; ISMB. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, 2, pp.28–36.

Baldassarre, G. et al., 2005. p27(Kip1)-stathmin interaction influences sarcoma cell migration and invasion. *Cancer cell*, 7(1), pp.51–63.

Bell, S.D. et al., 2002. The interaction of Alba, a conserved archaeal chromatin protein, with Sir2 and its regulation by acetylation. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5565), pp.148–51.

Benjamini, Y. & Hochberg, Y., 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 57(1), pp.289 – 300.

Besson, A. et al., 2006. A pathway in quiescent cells that controls p27Kip1 stability, subcellular localization, and tumor suppression. *Genes & development*, 20(1), pp.47–64.

Besson, A. et al., 2007. Discovery of an oncogenic activity in p27Kip1 that causes stem cell expansion and a multiple tumor phenotype. *Genes & development*, 21(14), pp.1731–46.].

Besson, A. et al., 2004. p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes & development*, 18(8), pp.862–76.

Besson, A., Dowdy, S.F. & Roberts, J.M., 2008. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Developmental cell*, 14(2), pp.159–69.].

Blain, S.W., 2008. Switching cyclin D-Cdk4 kinase activity on and off. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(7), pp.892–8.

Blanco-García, N. et al., 2009. Autoacetylation regulates P/CAF nuclear localization. *The Journal of biological chemistry*, 284(3), pp.1343–52.

Borriello, A. et al., 2007. p27Kip1 metabolism: a fascinating labyrinth. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 6(9), pp.1053–61.

Bresnahan, W.A. et al., 1996. Cyclin E/Cdk2 activity is controlled by different mechanisms in the G0 and G1 phases of the cell cycle. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 7(10), pp.1283–90.

Cánepa, E.T. et al., 2007. INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB life*, 59(7), pp.419–26.

Catzavelos, C. et al., 1997. Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nature medicine*, 3(2), pp.227–30.

Chamovitz, D.A. & Segal, D., 2001. JAB1/CSN5 and the COP9 signalosome. A complex situation. *EMBO reports*, 2(2), pp.96–101.

Cho, H. et al., 1998. A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure. *Molecular and cellular biology*, 18(9), pp.5355–63.

Choudhary, C. et al., 2009. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5942), pp.834–40.

Chu, I. et al., 2007. p27 phosphorylation by Src regulates inhibition of cyclin E-Cdk2. *Cell*, 128(2), pp.281–94.

Chu, I.M., Hengst, L. & Slingerland, J.M., 2008. The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nature reviews. Cancer*, 8(4), pp.253–67.

Claret, F.X. et al., 1996. A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors. *Nature*, 383(6599), pp.453–7.

Cobrinik, D., 2005. Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene*, 24(17), pp.2796–809.

Cohen, H.Y. et al., 2004. Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Molecular cell*, 13(5), pp.627–38.

Connor, M.K. et al., 2003. CRM1/Ran-mediated nuclear export of p27(Kip1) involves a nuclear export signal and links p27 export and proteolysis. *Molecular biology of the cell*, 14(1), pp.201–13.

Cuesta, R., Martínez-Sánchez, A. & Gebauer, F., 2009. miR-181a regulates cap-dependent translation of p27(kip1) mRNA in myeloid cells. *Molecular and cellular biology*, 29(10), pp.2841–51.

Dai, M. et al., 2012. A novel function for p21Cip1 and acetyltransferase p/CAF as critical transcriptional regulators of TGFβ-mediated breast cancer cell migration and invasion. *Breast cancer research : BCR*, 14(5), p.R127.

Dekker, J., 2008. Gene regulation in the third dimension. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5871), pp.1793–4.

Dhalluin, C. et al., 1999. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*, 399(6735), pp.491–6.

Dijkers, P.F. et al., 2000. Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1). *Molecular and cellular biology*, 20(24), pp.9138–48.

Dilworth, F.J. et al., 2004. In vitro transcription system delineates the distinct roles of the coactivators pCAF and p300 during MyoD/E47-dependent transactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(32), pp.11593–8.

Dorr, A. et al., 2002. Transcriptional synergy between Tat and PCAF is dependent on the binding of acetylated Tat to the PCAF bromodomain. *The EMBO journal*, 21(11), pp.2715–23.

Eblen, S.T. et al., 1995. Conditional binding to and cell cycle-regulated inhibition of cyclin-dependent kinase complexes by p27Kip1. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 6(8), pp.915–25.

Esposito, V. et al., 1997. Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer. *Cancer research*, 57(16), pp.3381–5.

Fero, M.L. et al., 1996. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell*, 85(5), pp.733–44.

Flaugh, S.L. & Lumb, K.J., 2001. Effects of macromolecular crowding on the intrinsically disordered proteins c-Fos and p27(Kip1). *Biomacromolecules*, 2(2), pp.538–40.

Fujita, N. et al., 2002. Akt-dependent phosphorylation of p27Kip1 promotes binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *The Journal of biological chemistry*, 277(32), pp.28706–13.

Galardi, S. et al., 2007. miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. *The Journal of biological chemistry*, 282(32), pp.23716–24.

Ge, X. et al., 2009. PCAF acetylates {beta}-catenin and improves its stability. *Molecular biology of the cell*, 20(1), pp.419–27.

Glozak, M.A. et al., 2005. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene*, 363, pp.15–23.

Grimmler, M. et al., 2007. Cdk-inhibitory activity and stability of p27Kip1 are directly regulated by oncogenic tyrosine kinases. *Cell*, 128(2), pp.269–80.

Ha, G.-H. et al., 2009. Mitotic catastrophe is the predominant response to histone acetyltransferase depletion. *Cell death and differentiation*, 16(3), pp.483–97.

Hanahan, D. & Weinberg, R. a, 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), pp.646–74.

Hartwell, L.H. & Weinert, T.A., 1989. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science (New York, N.Y.)*, 246(4930), pp.629–34.

Hateboer, G. et al., 1995. BS69, a novel adenovirus E1A-associated protein that inhibits E1A transactivation. *The EMBO journal*, 14(13), pp.3159–69.

Hauser, P.J. et al., 1997. The role of p27kip1 in the in vitro differentiation of murine keratinocytes. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 8(2), pp.203–11.

Hengst, L. & Reed, S.I., 1996. Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science (New York, N.Y.)*, 271(5257), pp.1861–4.

Herrera, J.E. et al., 1999. Specific acetylation of chromosomal protein HMG-17 by PCAF alters its interaction with nucleosomes. *Molecular and cellular biology*, 19(5), pp.3466–73.

Huang, D.W., Sherman, B.T. & Lempicki, R.A., 2009a. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic acids research*, 37(1), pp.1–13.

Huang, D.W., Sherman, B.T. & Lempicki, R.A., 2009b. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*, 4(1), pp.44–57.

Hubbard, T.J.P. et al., 2007. Ensembl 2007. *Nucleic acids research*, 35(Database issue), pp.D610–7.

Ianari, A. et al., 2004. Specific role for p300/CREB-binding protein-associated factor activity in E2F1 stabilization in response to DNA damage. *The Journal of biological chemistry*, 279(29), pp.30830–5.

Imhof, A. et al., 1997. Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Current biology : CB*, 7(9), pp.689–92.

Infante, P. et al., 2014. Yin-Yang strands of PCAF/Hedgehog axis in cancer control. *Trends in molecular medicine*.

Ishida, N. et al., 2002. Phosphorylation of p27Kip1 on serine 10 is required for its binding to CRM1 and nuclear export. *The Journal of biological chemistry*, 277(17), pp.14355–8.

Itoh, S. et al., 2000. The transcriptional co-activator P/CAF potentiates TGF-beta/Smad signaling. *Nucleic acids research*, 28(21), pp.4291–8.

Kamura, T. et al., 2004. Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1) at G1 phase. *Nature cell biology*, 6(12), pp.1229–35.

Kanehisa, M. et al., 2008. KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic acids research*, 36(Database issue), pp.D480–4.

Kato, J. et al., 1993. Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes & development*, 7(3), pp.331–42.

Kim, W.Y. & Sharpless, N.E., 2006. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell*, 127(2), pp.265–75.

King, R.W., Jackson, P.K. & Kirschner, M.W., 1994. Mitosis in transition. *Cell*, 79(4), pp.563–71.

Kleinjan, D.A. & van Heyningen, V., 2005. Long-range control of gene expression: emerging mechanisms and disruption in disease. *American journal of human genetics*, 76(1), pp.8–32.

Koff, A. et al., 1992. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science (New York, N.Y.)*, 257(5077), pp.1689–94.

Korah, J. et al., 2012. A transcriptionally active pRb-E2F1-P/CAF signaling pathway is central to TGFβ-mediated apoptosis. *Cell death & disease*, 3, p.e407.

Kotake, Y. et al., 2005. Role of serine 10 phosphorylation in p27 stabilization revealed by analysis of p27 knock-in mice harboring a serine 10 mutation. *The Journal of biological chemistry*, 280(2), pp.1095–102.

Kotoshiba, S. et al., 2005. Molecular dissection of the interaction between p27 and Kip1 ubiquitylation-promoting complex, the ubiquitin ligase that regulates proteolysis of p27 in G1 phase. *The Journal of biological chemistry*, 280(18), pp.17694–700.

LaBaer, J. et al., 1997. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes & development*, 11(7), pp.847–62.

LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680–685.

Lang, D. et al., 2007. PAX genes: roles in development, pathophysiology, and cancer. *Biochemical pharmacology*, 73(1), pp.1–14.

Langmead, B. et al., 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology*, 10(3), p.R25.

Larrea, M.D. et al., 2008. Phosphorylation of p27Kip1 regulates assembly and activation of cyclin D1-Cdk4. *Molecular and cellular biology*, 28(20), pp.6462–72.

Larrea, M.D. et al., 2009. RSK1 drives p27Kip1 phosphorylation at T198 to promote RhoA inhibition and increase cell motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(23), pp.9268–73.

Lee, K.K. & Workman, J.L., 2007. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(4), pp.284–95.

Lew, D.J. & Kornbluth, S., 1996. Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Current Opinion in Cell Biology*, 8(6), pp.795–804.

Li, H. et al., 2012. p27(Kip1) directly represses Sox2 during embryonic stem cell differentiation. *Cell stem cell*, 11(6), pp.845–52.

Linares, L.K. et al., 2007. Intrinsic ubiquitination activity of PCAF controls the stability of the oncoprotein Hdm2. *Nature cell biology*, 9(3), pp.331–8.

Liu, L. et al., 1999. p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Molecular and cellular biology*, 19(2), pp.1202–9.

Liu, Z. et al., 2012. Regulation of p27Kip1 by Sox2 maintains quiescence of inner pillar cells in the murine auditory sensory epithelium. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(31), pp.10530–40.

Loda, M. et al., 1997. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nature medicine*, 3(2), pp.231–4.

Lodish, H. et al., 2000. Molecular Cell Biology.

Love, I.M. et al., 2012. The histone acetyltransferase PCAF regulates p21 transcription through stress-induced acetylation of histone H3. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 11(13), pp.2458–66.

MacKenzie, K.F. et al., 2013. MSK1 and MSK2 inhibit lipopolysaccharide-induced prostaglandin production via an interleukin-10 feedback loop. *Molecular and cellular biology*, 33(7), pp.1456–67.

Malatesta, M. et al., 2013. Histone acetyltransferase PCAF is required for Hedgehog-Gli-dependent transcription and cancer cell proliferation. *Cancer research*, 73(20), pp.6323–33.

Malumbres, M. & Barbacid, M., 2005. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in biochemical sciences*, 30(11), pp.630–41.

Malumbres, M. & Barbacid, M., 2001. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 1(3), pp.222–31.

Marinoni, I. & Pellegata, N.S., 2011. p27kip1: a new multiple endocrine neoplasia gene? *Neuroendocrinology*, 93(1), pp.19–28.

Maston, G.A., Evans, S.K. & Green, M.R., 2006. Transcriptional Regulatory Elements in the Human Genome.

Mateo, F. et al., 2009. The transcriptional co-activator PCAF regulates cdk2 activity. *Nucleic acids research*, 37(21), pp.7072–84.

Mattick, J.S., 2004. RNA regulation: a new genetics? *Nature reviews. Genetics*, 5(4), pp.316–23.

Mazzà, D. et al., 2013. PCAF ubiquitin ligase activity inhibits Hedgehog/Gli1 signaling in p53-dependent response to genotoxic stress. *Cell death and differentiation*, 20(12), pp.1688–97.

Medema, R.H. et al., 2000. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature*, 404(6779), pp.782–7.

Millard, S.S. et al., 1997. Enhanced ribosomal association of p27(Kip1) mRNA is a mechanism contributing to accumulation during growth arrest. *The Journal of biological chemistry*, 272(11), pp.7093–8.

Moeller, S.J., Head, E.D. & Sheaff, R.J., 2003. p27Kip1 inhibition of GRB2-SOS formation can regulate Ras activation. *Molecular and cellular biology*, 23(11), pp.3735–52.

Mujtaba, S. et al., 2002. Structural Basis of Lysine-Acetylated HIV-1 Tat Recognition by PCAF Bromodomain. *Molecular Cell*, 9(3), pp.575–586.

Nagy, Z. & Tora, L., 2007. Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene*, 26(37), pp.5341–57.

Nakayama, K. et al., 1996. Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell*, 85(5), pp.707–20.

Nguyen, D.X. et al., 2004. Acetylation regulates the differentiation-specific functions of the retinoblastoma protein. *The EMBO journal*, 23(7), pp.1609–18.

Nguyen, L. et al., 2006. p27kip1 independently promotes neuronal differentiation and migration in the cerebral cortex. *Genes & development*, 20(11), pp.1511–24.

Nickeleit, I. et al., 2007. p27kip1: a target for tumor therapies? *Cell division*, 2, p.13.

Nye, M.D. et al., 2014. The Transcription Factor GLI1 Interacts with SMAD Proteins to Modulate Transforming Growth Factor β-Induced Gene Expression in a p300/CREB-binding Protein-associated Factor (PCAF)-dependent Manner. *The Journal of biological chemistry*, 289(22), pp.15495–15506.

Ogryzko, V. V et al., 1998. Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. *Cell*, 94(1), pp.35–44.

Ogryzko, V. V et al., 1996. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, 87(5), pp.953–9.

Okumura, K. et al., 2006. PCAF modulates PTEN activity. *The Journal of biological chemistry*, 281(36), pp.26562–8.

Ou, L., Waddell, M.B. & Kriwacki, R.W., 2012. Mechanism of cell cycle entry mediated by the intrinsically disordered protein p27(Kip1). *ACS chemical biology*, 7(4), pp.678–82.

Pardee, A.B., 1974. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(4), pp.1286–90.

Patel, J.H. et al., 2004. The c-MYC oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60. *Molecular and cellular biology*, 24(24), pp.10826–34.

Pavesi, G. et al., 2004. Weeder Web: discovery of transcription factor binding sites in a set of sequences from co-regulated genes. *Nucleic acids research*, 32(Web Server issue), pp.W199–203.

Perez-Llamas, C. & Lopez-Bigas, N., 2011. Gitools: analysis and visualisation of genomic data using interactive heat-maps. S. Aerts, ed. *PloS one*, 6(5), p.e19541.

Pérez-Luna, M. et al., 2012. PCAF regulates the stability of the transcriptional regulator and cyclin-dependent kinase inhibitor p27 Kip1. *Nucleic acids research*, 40(14), pp.6520–33.

Pink, R.C. et al., 2011. Pseudogènes: pseudo-functional or key regulators in health and disease? *RNA (New York, N.Y.)*, 17(5), pp.792–8.

Pippa, R. et al., 2012. p27Kip1 represses transcription by direct interaction with p130/E2F4 at the promoters of target genes. *Oncogene*, 31(38), pp.4207–20.

Planas-Silva, M.D. & Weinberg, R.A., 1997. The restriction point and control of cell proliferation. *Current opinion in cell biology*, 9(6), pp.768–72.

Poliseno, L. et al., 2010. A coding-independent function of gene and pseudogène mRNAs regulates tumour biology. *Nature*, 465(7301), pp.1033–8.

Polyak, K. et al., 1994. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell*, 78(1), pp.59–66.

Polyak, K. et al., 1994. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell*, 78(1), pp.59–66.

Porter, P.L. et al., 1997. Expression of cell-cycle regulators p27Kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nature medicine*, 3(2), pp.222–5.

Puri, P.L. et al., 1997. Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation. *Molecular cell*, 1(1), pp.35–45.

Quaroni, A. et al., 2000. p27(Kip1) is an inducer of intestinal epithelial cell differentiation. *American journal of physiology. Cell physiology*, 279(4), pp.C1045–57.

Quinlan, A.R. & Hall, I.M., 2010. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26(6), pp.841–2.

Ray, A. et al., 2009. p27Kip1 inhibits cyclin D-cyclin-dependent kinase 4 by two independent modes. *Molecular and cellular biology*, 29(4), pp.986–99.

Reid, J.L. et al., 1998. E1A directly binds and regulates the P/CAF acetyltransferase. *The EMBO journal*, 17(15), pp.4469–77.

Rice, J.C. & Allis, C.D., 2001. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(3), pp.263–273.

Robson, E.J.D., He, S.-J. & Eccles, M.R., 2006. A PANorama of PAX genes in cancer and development. *Nature reviews. Cancer*, 6(1), pp.52–62.

Roussel, M.F., 1999. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene*, 18(38), pp.5311–7.

Russo, A.A. et al., 1996. Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature*, 382(6589), pp.325–31.

S, L., 2005. Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction.

Sadoul, K. et al., 2008. Regulation of protein turnover by acetyltransferases and deacetylases. *Biochimie*, 90(2), pp.306–12.

Santos-Rosa, H. et al., 2003. Mechanisms of P/CAF auto-acetylation. *Nucleic acids research*, 31(15), pp.4285–92.

Sartorelli, V. et al., 1999. Acetylation of MyoD Directed by PCAF Is Necessary for the Execution of the Muscle Program. *Molecular Cell*, 4(5), pp.725–734.

Schiltz, R.L. & Nakatani, Y., 2000. The PCAF acetylase complex as a potential tumor suppressor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1470(2), pp.M37–M53.

Schones, D.E., Smith, A.D. & Zhang, M.Q., 2007. Statistical significance of cis-regulatory modules. *BMC bioinformatics*, 8(1), p.19.

Sharon Y. Roth, John M. Denu & Allis, C.D., 2003. HISTONE ACETYLTRANSFERASES.

Shen, M. et al., 2013. The chromatin remodeling factor CSB recruits histone acetyltransferase PCAF to rRNA gene promoters in active state for transcription initiation. *PloS one*, 8(5), p.e62668.

Sherr, C.J. & Roberts, J.M., 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & development*, 13(12), pp.1501–12.

Shin, H. et al., 2009. CEAS: cis-regulatory element annotation system. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 25(19), pp.2605–6.

Singh, S.P. et al., 1998. Loss or Altered Subcellular Localization of p27 in Barrett's Associated Adenocarcinoma. *Cancer Res.*, 58(8), pp.1730–1735.

Sivakolundu, S.G., Bashford, D. & Kriwacki, R.W., 2005. Disordered p27Kip1 exhibits intrinsic structure resembling the Cdk2/cyclin A-bound conformation. *Journal of molecular biology*, 353(5), pp.1118–28.

Smits, P. et al., 2004. Sox5 and Sox6 are needed to develop and maintain source, columnar, and hypertrophic chondrocytes in the cartilage growth plate. *The Journal of cell biology*, 164(5), pp.747–58.

Starheim, K.K., Gevaert, K. & Arnesen, T., 2012. Protein N-terminal acetyltransferases: when the start matters. *Trends in biochemical sciences*, 37(4), pp.152–61. h

Sterner, D.E. & Berger, S.L., 2000. Acetylation of Histones and Transcription-Related Factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(2), pp.435–459.

Stimson, L. et al., 2005. Isothiazolones as inhibitors of PCAF and p300 histone acetyltransferase activity. *Molecular cancer therapeutics*, 4(10), pp.1521–32.

Sugiyama, Y. et al., 2001. Direct binding of the signal-transducing adaptor Grb2 facilitates down-regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. *The Journal of biological chemistry*, 276(15), pp.12084–90.

Suo, G. et al., 2005. Oct4 pseudogènes are transcribed in cancers. *Biochemical and biophysical research communications*, 337(4), pp.1047–51.

Timmerbeul, I. et al., 2006. Testing the importance of p27 degradation by the SCFskp2 pathway in murine models of lung and colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(38), pp.14009–14.

Tomoda, K., Kubota, Y. & Kato, J., 1999. Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1. *Nature*, 398(6723), pp.160–5.

Toyoshima, H. & Hunter, T., 1994. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell*, 78(1), pp.67–74.

Vandeva, S. et al., 2010. Familial pituitary adenomas. *Annales d'endocrinologie*, 71(6), pp.479–85.

Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R. & Berneman, Z.N., 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation*, 36(3), pp.131–49.

Vernon, A.E. et al., 2006. Notch targets the Cdk inhibitor Xic1 to regulate differentiation but not the cell cycle in neurons. *EMBO reports*, 7(6), pp.643–8.

Vernon, A.E. & Philpott, A., 2003. A single cdk inhibitor, p27Xic1, functions beyond cell cycle regulation to promote muscle differentiation in Xenopus. *Development (Cambridge, England)*, 130(1), pp.71–83.

Vervoorts, J. & Lüscher, B., 2008. Post-translational regulation of the tumor suppressor p27(KIP1). *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65(20), pp.3255–64.

Wang, C. et al., 2005. Activation of p27Kip1 Expression by E2F1. A negative feedback mechanism. *The Journal of biological chemistry*, 280(13), pp.12339–43.

Wang, Q. et al., 2008. Pax genes in embryogenesis and oncogenesis. *Journal of cellular and molecular medicine*, 12(6A), pp.2281–94.

Wang, Z. et al., 2009. Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. *Cell*, 138(5), pp.1019–31.

Wei, Q., Miskimins, W.K. & Miskimins, R., 2003. The Sp1 family of transcription factors is involved in p27(Kip1)-mediated activation of myelin basic protein gene expression. *Molecular and cellular biology*, 23(12), pp.4035–45..

West, A.G. & Fraser, P., 2005. Remote control of gene transcription. *Human molecular genetics*, 14 Spec No(suppl_1), pp.R101–11.

Wu, F.Y. et al., 2006. Reduction of cytosolic p27(Kip1) inhibits cancer cell motility, survival, and tumorigenicity. *Cancer research*, 66(4), pp.2162–72.

Yang, X.J. et al., 1996. A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature*, 382(6589), pp.319–24.

Zhang, H.-S. et al., 2012. PAX2 protein induces expression of cyclin D1 through activating AP-1 protein and promotes proliferation of colon cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, 287(53), pp.44164–72.

Zhang, W. et al., 2007. BS69 is involved in cellular senescence through the p53-p21Cip1 pathway. *EMBO reports*, 8(10), pp.952–8.

Zhang, Y. et al., 2008. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome biology*, 9(9), p.R137.

Zhao, L.Y. et al., 2003. PCAF is a coactivator for p73-mediated transactivation. *Oncogene*, 22(51), pp.8316–29.

Zhu, L.J. et al., 2010. ChIPpeakAnno: a Bioconductor package to annotate ChIP-seq and ChIP-chip data. *BMC bioinformatics*, 11, p.237.

PUBLICACIÓ

PUBLICACIÓ

6520–6533 Nucleic Acids Research, 2012, Vol. 40, No. 14 Published online 29 April 2012
doi:10.1093/nar/gks343

PCAF regulates the stability of the transcriptional regulator and cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1}

Maria Pérez-Luna[1], Marta Aguasca[1], Anna Perearnau[1], Joan Serratosa[2], Marian Martínez-Balbas[3], Maria Jesús Pujol[1] and Oriol Bachs[1,*]

[1]Department of Cell Biology, Immunology and Neurosciences, Institut d'Investigacions Biomèdiques August-Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, 08036-Barcelona, [2]Department of Cerebral Ischemia and Neurodegeneration, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC-IDIBAPS), 08036-Barcelona and [3]Instituto de Biología Molecular de Barcelona, CSIC, Parc Científic de Barcelona, 08028-Barcelona, Spain

Received February 10, 2012; Revised April 10, 2012; Accepted April 11, 2012

ABSTRACT

P27^{Kip1} (p27) is a member of the Cip/Kip family of cyclin-dependent kinase inhibitors. Recently, a new function of p27 as transcriptional regulator has been reported. It has been shown that p27 regulates the expression of target genes mostly involved in splicing, cell cycle, respiration and translation. We report here that p27 directly binds to the transcriptional coactivator PCAF by a region including amino acids 91–120. PCAF associates with p27 through its catalytic domain and acetylates p27 at lysine 100. Our data showed that overexpression of PCAF induces the degradation of p27 whereas in contrast, the knockdown of PCAF stabilizes the protein. A p27 mutant in which K100 was substituted by arginine (p27-K100R) cannot be acetylated by PCAF and has a half-life much higher than that of p27WT. Moreover, p27-K100R remains stable along cell-cycle progression. Ubiquitylation assays and the use of proteasome inhibitors indicate that PCAF induces p27 degradation via proteasome. We also observed that knockdown of skp2 did not affect the PCAF induced degradation of p27. In conclusion, our data suggest that the p27 acetylation by PCAF regulates its stability.

INTRODUCTION

Cell-cycle progression is regulated by the sequential activation of members of the cyclin-dependent kinase (cdk) family (1). Quiescent cells contain significant levels of cdk4 and cdk2 but only very small amounts of cyclins. Since cyclins associate with and activate cdks, quiescent cells only display very low cdk activity. After mitogenic stimulation cells synthesize cyclin D that associates with cdk4 that as a consequence becomes activated (2). The main function of active cyclin D–cdk4 complexes at early G1 phase of the cell cycle is to phosphorylate transcriptional repressor complexes containing E2F4/p130 or E2F1/pRb that are additionally associated with different transcriptional corepressors (3,4). In quiescent cells, these complexes repress the expression of a number of genes necessary for the onset of DNA replication. Cdk4 phosphorylation of p130, pRb and other proteins of these complexes at early G1, disorganize some of them allowing transcription of a number of genes, including cyclin E that accumulates in the cells at mid-late G1. Then, cyclin E binds to and activates cdk2 that additionally phosphorylate p130 and pRb to finally disrupt the repressor complexes. This leads to the expression of the S phase genes needed for the onset of DNA synthesis.

In addition to the association with cyclins, cdk activity is also regulated by phosphorylation, acetylation and by association with specific cdk inhibitors (CKIs) (5–7). There are two families of CKIs: The Cip/Kip family that includes p21, p27 and p57 and that associate with and inhibit most cyclin–cdk complexes. In contrast, the members of the other family (ink4) including p15, p16, p18 and p19 specifically bind to and inhibit cdk4 and cdk6 (5,8).

Among these CKIs, p27 is specifically relevant because its deficiency is associated with tumorigenesis. Reduced p27 levels are frequently observed in human cancers in

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +93 4035286; Fax: +93 4021907; Email: obachs@ub.edu

The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as joint First Authors.

© The Author(s) 2012. Published by Oxford University Press.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

association with tumor aggressiveness and poor clinical outcome (9–11). In most of the cases, low levels of p27 in human tumors are due to post-transcriptional regulation that leads to an increased proteasome-dependent degradation (12–14). The role of p27 in tumorigenesis is supported by the evidence that $p27^{-/-}$—mice spontaneously develop pituitary tumors and are much more susceptible to tumorigenesis induced by chemical carcinogens than $p27^{wt}$—mice (15–17). Moreover, *knock in* mice harboring a p27 mutant ($p27^{CK}$), including four punctual mutations that unables it to interact with and to inhibit cyclin–cdk complexes, develop hyperplasias and tumors in many different organs (18). These data clearly indicate that p27 performs other cellular functions, involved in tumorigenesis, that are independent of its role as a CKI.

We have recently reported that p27 plays a role as a transcriptional regulator (19). Specifically, by ChIP on chip, we have observed that p27 associates with 427 promoters of genes mainly involved in cell-cycle regulation, respiration, translation and RNA processing and splicing. Interestingly, the overexpression of these p27-target genes (p27-TGs) in human tumors correlates with poor clinical outcome. These results suggest that the transcriptional regulatory function of p27 plays an important role in the development of tumors.

On a significant number of these p27-TG promoters p27 is associated with E2F4/p130 repressor complexes. Interestingly, we found that in fact p27 directly interacts with E2F4 and p130 by its carboxyl moiety. Thus, p27 is a structural component of these repressor complexes that operate in quiescent cells to repress the S phase genes. According to that, expression microarrays analysis performed on embryo fibroblasts (MEFs) from $p27^{WT}$, $p27^{-/-}$ and $p27^{CK-}$ revealed that p27 behaves as a transcriptional repressor of these p27-TGs (19). The specific role of p27 on these repressor complexes still remains to be clarified but a possibility is that in addition to its repressive role it may also participate in the recruitment on cyclin–cdk complexes needed for p130 phosphorylation at early-mid G1 phase. The evidence showing that the interaction of p27 with E2F4/p130 complexes is through its carboxyl moiety indicates that its amino moiety (that contains the cyclin and cdk interacting domains) will be free to associate with cyclin–cdk complexes when they will appear at early G1. However, this possibility still remains to be clarified.

On searching for nuclear proteins that interact with p27 in quiescent cells we observed that the acetyl transferase and transcriptional coactivator PCAF (6) associates with p27 in these cells. We report here that PCAF directly interacts with and acetylates p27 in the K100 residue. We have identified the PCAF interacting domain of p27 and demonstrated that acetylation of p27 by PCAF induces its degradation via proteasome. These results are compatible with a role of PCAF as a coactivator of p27-TGs by inducing the degradation of p27, a transcriptional repressor of these genes.

MATERIALS AND METHODS

Materials

ALLNL and MG132 were purchased from Calbiochem. [^{14}C]acetylCoA from Perkin Elmer. Histones and cycloheximide were from Sigma-Aldrich. Rabbit reticulocyte extracts (L4151) were from Promega. The following antibodies were used in this work: Acetyl-Lys (600-401-939), from Rockland Immunochemicals; $p27^{Kip1}$ (sc-528 and sc-527) from Santa Cruz, Biotechnology and (610242) from BD transduction labs; cyclin D1 (Sc-20044) and Skp2 (sc-7164) from Santa Cruz Biotechnology; PCAF (P7493), ubiquitin (U5379) and Flag (F7425) from Sigma-Aldrich; actin (69100) from MP Biomedicals; $p21^{Cip1}$ (OP64) from Calbiochem and GFP (ab290) from Abcam.

Plasmids

The p21 full length, the full-length p27 and the following mutants of p27 were purchased from Genscript: p27WT, p27-K13R in which all lysines of p27 were substituted for arginines, p27–K5R (K47R,K59R,K68R,K73R, K81R). p27-K3R (K25R,K96R,K100R), p27–K2R (K96R,K100R), p27–K100R, p27(Δ91–120), p27(Δ91–100), p27(Δ96–100) and p27(Δ91–95). All these sequences were subsequently subcloned in a pECFP–C1 vector (Clontech). pCDNA3–Flag–PCAF (FlagPCAF), pCDNA3–GFP–Flag–PCAF (GFPCtWT) and pCDNA3–GFP–Flag–PCAFΔHAT (352–832, lacking amino acids 527–547) (GFP–CtΔHAT) have been described elsewhere (20). The shRNA corresponding to PCAF (pLKO-1, puro-PCAF) and the shRNA random (pLKO-1, puro) used as a control were from Sigma-Aldrich. The siRNA corresponding to Skp2 and to GFP were from Dharmacon.

Recombinant proteins

pGEX vectors (Amersham) containing: the full-length p27, the different mutants and fragments of this protein, p21, GST or CBP were transformed into *Escherichia coli* BL21 strain. The expressed proteins were subsequently purified as previously described (21). The plasmids pGEX–PCAF (GSTPCAF), pGEX–PCAF(352–658) (GSTHAT) and pGEXPCAF(352–832, lacking amino acids 527–547) (GSTCtΔHAT) have been previously described (22,23).

Cell culture and transfection

HEK 293T and HeLa cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Biological Industries) containing 10% fetal calf serum (FCS). HCT116 cells were cultured in DEMEM:HAM (1:1) complemented with 2 mM Glutamine, 1% non-essential amino acids, 1 mM piruvic acid and 10% FCS. In some experiments the proteasome inhibitors ALLNL (100 μM) or MG132 (10 μM) were added to the culture medium. Transfection of HCT116 and HET293T cells was performed with Lypofectamine 2000 or Lipofect, respectively as directed by the manufacturer (Qiagen). Cells were harvested 24 h after transfection. To synchronize the different cellular

PUBLICACIÓ

types, they were cultured for 48–72 h in 0.5% FCS media. Then, cells were replated in media with 10% FCS and subsequently collected at different times after replating.

Affinity chromatography

To generate the different chromatography columns the purified proteins or peptides were covalently bound to CNBr-activated sepharose 4B, according to the manufacturers (Amersham). The peptides used in these experiments were purchased from GenScript. Cell were lysed with buffer A (50 mM HEPES, pH 7.6, 50 mM KCl, 1 mM EDTA and 1 mM $MgCl_2$). Then, cell extracts (10 mg) were loaded onto the columns and after washing in 50 vol. of buffer A containing 150 mM KCl, the bound proteins were eluted with the same buffer but containing 1.5 M KCl (21). Then, they were subsequently eluted with 0.1 M Na–acetate and 0.5 M NaCl at pH 4.5. To analyze the direct binding of purified proteins to the columns the same protocol was used but loading 5–10 μg of the purified proteins onto the columns.

Immunoprecipitation and western blotting

Cells were lysed in RIPA buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP40, 0.5% deoxycolate, 0.1% SDS and 3.3 μM TSA) containing 50 mM NaF, 1 mM phenylmehylsulfonyl fluoride, 0.1 mM Na_3VO_4, 0.5 μg/μl aprotinin and 10 μg/μl Leupeptin) for 30 min on ice. For the immunoprecipitation (IP) experiments, lysates were incubated with 4 μg of specific antibodies overnight at 4°C. Then, protein A/G agarose beads (Pearce) were added and samples were incubated for 45 min at 4°C. After three washes with RIPA buffer, immunoprecipitates were subjected to western blotting (WB) as described (24).

In vitro acetylation assay

Protein acetyltransferase assays were performed in 30 μl of HAT lysis buffer (50 mM Tris, pH 8.0, 50 mM KCl, 5% glycerol and 1 mM EDTA), 1 μl (0.02 μCi) of [^{14}C]-acetyl-CoA (Perkin Elmer), 6 μM of substrate proteins or histones and 300 ng of recombinant HAT domains of PCAF or CBP. Reactions were performed for 30 min at 30°C. Then, proteins were separated by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), transferred to nitrocellulose membranes and exposed to film for 2–4 days.

In vitro ubiquitylation assay

Recombinant GSTp27 and GSTp27K100R were acetylated with recombinant GSTHAT domain of PCAF as described above. After acetylation, 60 μl of reticulocyte cell lysate (Promega) were added to the reaction as a source of ubiquitin and ubiquitylation enzymes. The mixture was incubated for 1 h at 37°C and then, the recombinant GST-fusion substrates were re-purified using glutathione–agarose beads (Amersham) as described by the manufacturer. The GST-fusion substrates were separated by SDS–PAGE and the presence of ubiquitylated p27 forms was analyzed by WB using anti-ubiquitin antibodies. Similar experiments were performed and the proteins transferred to nitrocelulose membranes. Then, the radioactivity incorporated into the proteins was detected by autoradiography for 2–4 days.

Spot mapping analysis

Nine peptides, each one containing one of the lysines present in the N-terminus of p27 were generated (Genosys). The selected sequences were: (i) KSTGGKAPRKQ (histone H3 peptide as a positive control); (ii) RQAEHPKPSACR; (iii) LTRDLEKHCRDM; (iv) EEASQRKWNFDF; (v) NFDFQNHKPLEG; (vi) PLEGKYEWQEVE; (vii) WQEVEKGSLPEF; (viii) YYRPPRPPKGAC; (ix) GACKVPAQESQD. Peptides (5 nmol) were spotted on a nitrocellulose membrane and then the membrane was subjected to an *in vitro* acetylation assay as described above.

Protein stability assay

Cells were transfected for 20 h with FlagPCAF expression vector or with a pCDNA empty vector as a control. Then, 10 μg/ml of cycloheximide (Sigma) were added to the cell cultures and cells were harvested at different times after cycloheximide addition. Finally, samples were subjected to WB using anti-p27, anti-PCAF or anti-actin that was used as a loading control. Similar experiments were performed to study the stability of the ectopic p27WT or the non-acetylatable mutant p27K100R. In these experiments, HCT116 cells were transfected with pCDNAp27WT or pCDNAK100R expression vectors or with a pCDNA empty vector as a control.

Immunofluorescence

To detect CFP–p27 and YFP–PCAF by immunofluorescence, HCT116 cells with transfected with vectors containing these genes and grown in coverslips, fixed in 4% paraformaldehyde/PBS for 15 min at room temperature and washed in PBS. After fixation, cells were stained with DAPI for the nuclear visualization. Then, coverslips were mounted on glass slides with Mowiol (Calbiochem) and analyzed by fluorescence microscopy.

RESULTS

The protein p27 interacts with the acetyltransferase PCAF

To identify new p27-binding proteins, extracts from HCT116 cells were loaded on a p27–Sepharose 4B column and the proteins associated with p27 were subsequently eluted and analyzed by mass spectrometry. A protein of 89 kDa from the eluates was identified as PCAF by mass spectrometry (data not shown). The binding of PCAF to the p27 column was confirmed by WB (Figure 1A). Direct *in vitro* interaction between PCAF and p27 was examined by affinity chromatography. Purified recombinant GST–PCAF or the catalytic domain of PCAF (GST–HAT), were separately loaded on a p27 column and the binding analyzed. Results showed that both, full-length PCAF (Figure 1B) and the HAT domain (Figure 1C) associated with the p27 column,

PUBLICACIÓ

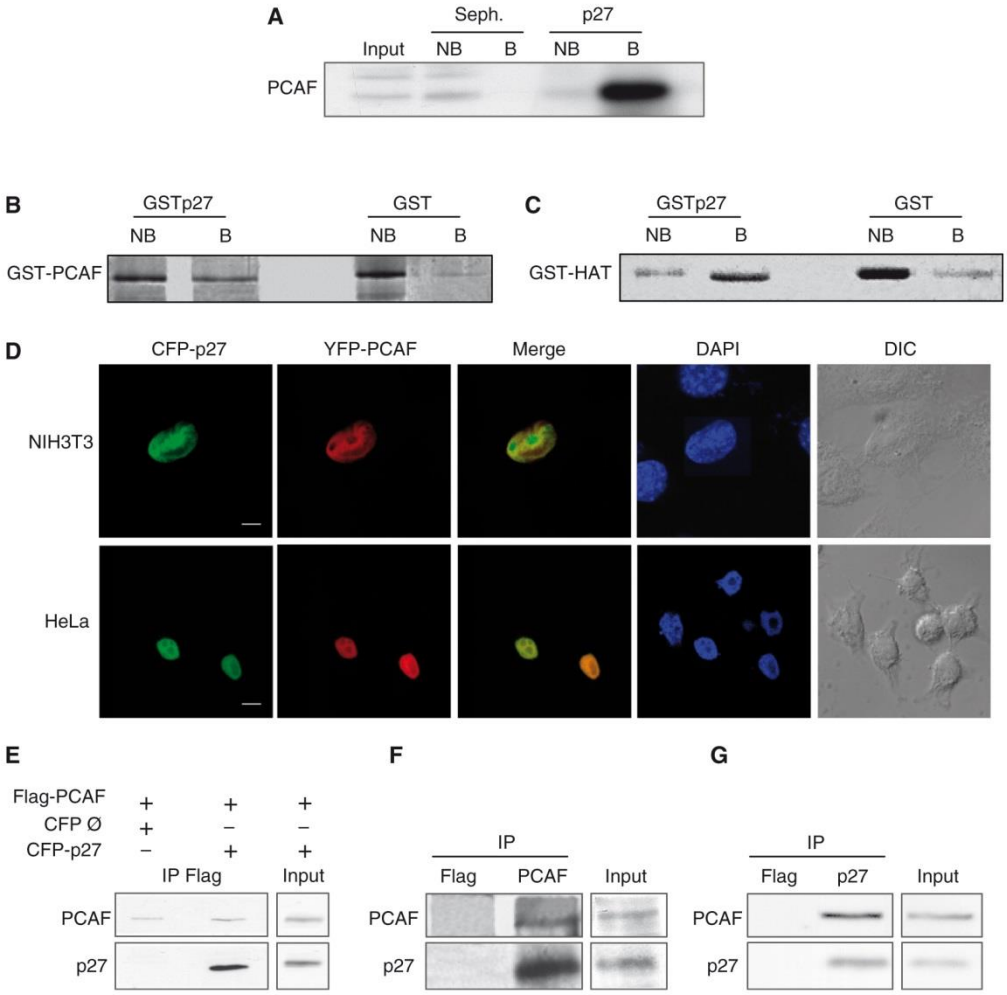


Figure 1. Interaction of p27 with PCAF. (**A**) HCT116 cell extracts were loaded on a p27 or a Sepharose 4B column (Seph.). Proteins not bound (NB) or bound (B) to the columns were analyzed by WB using an anti-PCAF antibody. (**B**) Purified GST–PCAF was loaded on a GST–p27 or on a GST column. Fractions not bound (NB) or bound (B) to the columns were visualized by gel electrophoresis and Coomassie blue staining. (**C**) Purified GST–HAT was loaded on a GST–p27 or a GST column. Fractions not bound (NB) or bound (B) to the columns were visualized by gel electrophoresis and coomassie blue staining. (**D**) NIH3T3 and HeLa cells were cotransfected with CFP–p27 and YFP–PCAF, stained with DAPI and subsequently visualized by confocal microscopy. Bar: 5 μm (**E**) HEK293T cells were transfected with Flag–PCAF or/and CFP–p27. At 24 h post-transfection, cell extracts were immunoprecipitated with anti-Flag. Cells transfected with an empty CFP vector (Ø) and Flag–PCAF were used as a control. The immunoprecipitates were then analyzed by WB using antibodies against PCAF or p27. (**F**) HEK293T cell extracts were subjected to IP with anti-PCAF or anti-Flag (as a control), then, the immunoprecipitates were analyzed by WB using antibodies against PCAF or p27. (**G**) HEK293T cell extracts were subjected to IP with anti-p27 or anti-Flag (as a control), then, the immunoprecipitates were analyzed by WB using antibodies against PCAF or p27.

indicating that PCAF directly interacts with p27 by its catalytic domain. Colocalization experiments were subsequently performed in HCT116 cells cotransfected with CFP–p27 and YFP–PCAF. As shown in Figure 1D both proteins colocalize in the nucleus. To determine whether p27 and PCAF interact in the cells, we used HEK 293T cells that were cotransfected with YFP–Flag–PCAF and CFP–p27. Then, IP with anti-Flag were performed. Results showed the co-IP of both proteins (Figure 1E). We also observed the co-IP of the endogenous PCAF and p27 by using anti-PCAF (Figure 1F) or anti-p27 antibodies (Figure 1G).

The PCAF-interacting domain of p27 includes amino acids 91–120 and contains a proline-rich domain

To identify the PCAF-interacting domain (PID) of p27, affinity chromatography experiments using different p27 fragments were performed. We first generated two affinity columns using the fragments p27–NT (amino acids 1–110)

PUBLICACIÓ

and p27–CT (amino acids 110–198) (Figure 2A). Purified PCAF was loaded onto both columns and its association analyzed by WB. As shown in Figure 2B (upper and middle panels), PCAF did not associate with any of both fragments of p27 indicating that the PID was lost with fragmentation. In contrast, we observed that PCAF associates with p27(amino acids 1–135) (Figure 2B, bottom panel). We subsequently studied the association of PCAF with the peptides p27(amino acids 91–120) and p27(amino acids 101–120). Results revealed that p27(91–120) associated with PCAF whereas p27(amino acids 101–120) did not (Figure 2C). These data indicated that the PID is included in the amino acids 91–120 region of p27. To further confirm that this region corresponds to the PID of p27 we generated three deletion mutants, specifically: p27(Δ91–100), p27(Δ96–100) and p27(Δ91–95) (Figure 2D). Purified mutant proteins were loaded onto a GST–HAT column and the interaction analyzed. As shown in Figure 2E when a large part of the PID domain was deleted as in the p27(Δ91–100) mutant, the association with PCAF was totally lost whereas shorter deletions as in p27(Δ96–100) and p27(Δ91–95) still retained the ability to interact with PCAF. Interestingly, this region includes a proline-rich domain (PRD) (amino acids 91–96) (Figure 2A) although as shown in Figure 2E its role in the association with PCAF is not essential. To validate the PID of p27 in the cells, we used HEK293T cells that were cotransfected with the deletion mutants p27(Δ91–100) or p27(Δ91–120) together with Flag–PCAF and subsequently subjected to IP with anti-Flag. Results clearly indicated that the interaction of PCAF with both mutants was strongly reduced (Figure 2F and G).

PCAF acetylates p27 at Lys 100

To study whether p27 is acetylated by PCAF, *in vitro* acetyltransferase assays were performed. Results indicated that p27 was acetylated *in vitro* by PCAF (Figure 3A). Similar experiments showed that PCAF was not able to acetylate $p21^{Cip1}$, another member of the Cip/Kip family of inhibitors (Figure 3B). We also observed that p27 could not be acetylated by CBP, a protein belonging to another family of acetyltransferases (Figure 3C).

Next, we studied the acetylation of p27 in the cells by IP with anti-p27 followed by WB with anti-acetyl-Lys. To this aim, HEK 293T cells were transfected with CFP–p27 and PCAF. As a negative control, cells were transfected with a p27 mutant in which all lysines were substituted by arginines (p27–K13R). Results indicated that p27WT was acetylated whereas the mutant p27(K13R) did not (Figure 3D, left panel). Similar experiments revealed that p21 was not acetylated in the cells (Figure 3D, right panel). Finally, we also observed the acetylation of endogenous p27 by IP with anti-p27 followed by WB with anti-acetyl-Lys (Figure 3E).

To identify the acetylation site/s of p27 we first performed *in vitro* acetylation assays using two p27 fragments, p27(1–110) and p27(110–198). Results indicated that p27(1–110) but not p27(110–198) was acetylated *in vitro* by PCAF (Figure 4A). The p27(1–110) fragment contains eight lysine residues at positions K25, K47, K59, K68, K73, K81, K96 and K100. To identify the residues that might be acetylated by PCAF, *in vitro* 'spot mapping' experiments were performed. Thus, eight peptides, each one containing one of the lysines present in this fragment, were synthesized and spotted on a nitrocellulose membrane. Additionally, a peptide from histone H3 was used as a positive control (Figure 4B). Then, this membrane was subjected to an *in vitro* acetylation assay using PCAF as acetylase. Results indicated that the control peptide and peptides containing K25, K96 and K100 were acetylated by PCAF (Figure 4C). To analyze whether these lysines were the acetylation sites in the full-length p27 protein, mutational analysis were performed. GST–p27 proteins harboring different K for R substitutions were used as substrates for *in vitro* acetylation assays. Results revealed that the triple mutant p27–K3R (K25R, K96R and K100R), the double mutant p27–2R (K96R and K100R) and the single mutant p27–K100R were not acetylated by PCAF (Figure 4D). These results indicated that K100 in p27 is the specific acetylation site for PCAF. Finally, acetylation assays were performed in HEK293T cells. Cells were transfected with different forms of p27 and with an empty vector as a control. Then, after an IP with anti-p27 the acetylation status of the protein was determined by WB with an anti-acetyl-lysine. Results revealed that p27WT was acetylated whereas the mutants p27–K3R or p27K100R did not (Figure 4E), indicating that K100 is the specific acetylation site of p27 also in the cells. As an additional positive control we also determined the acetylation status of the mutant p27–K5R (K47R, K59R, K68R, K73R and K81R) that was acetylated as it can be observed in Figure 4E. Finally, as a negative control we tested the acetylation of the mutant p27K13R and of the mutant p27(Δ91–120) that lacks the PID and K100. As shown in Figure 4E and F these mutants were not acetylated.

PCAF associates with and acetylates p27 along the cell cycle

We subsequently aimed to analyze the functional relevance of p27 acetylation. Thus, we first studied by WB the levels of PCAF along the cell cycle. HeLa cells were arrested in G_0 by serum starvation (0 h) and later on they were induced to enter the cell cycle by serum addition. Then, at different times samples were collected and analyzed by WB with antibodies against PCAF. The levels of cyclin D1 and p27 were also analyzed to monitor cell-cycle entry whereas anti-actin was used as a loading control (Figure 5A). Results from three different WB with anti-PCAF were quantified and represented as a regression line (Figure 5B). Similarly, three different WB with anti-cyclin D1 and anti-p27 were quantified and represented in Figure 5C. These data revealed that the amount of PCAF remained constant at least during the first 12 h after cell-cycle entry. In contrast, levels of p27 were high in arrested cells (0 h) and progressively decreased whereas those of cyclin D1 increased along cell-cycle progression (Figure 5C). We subsequently

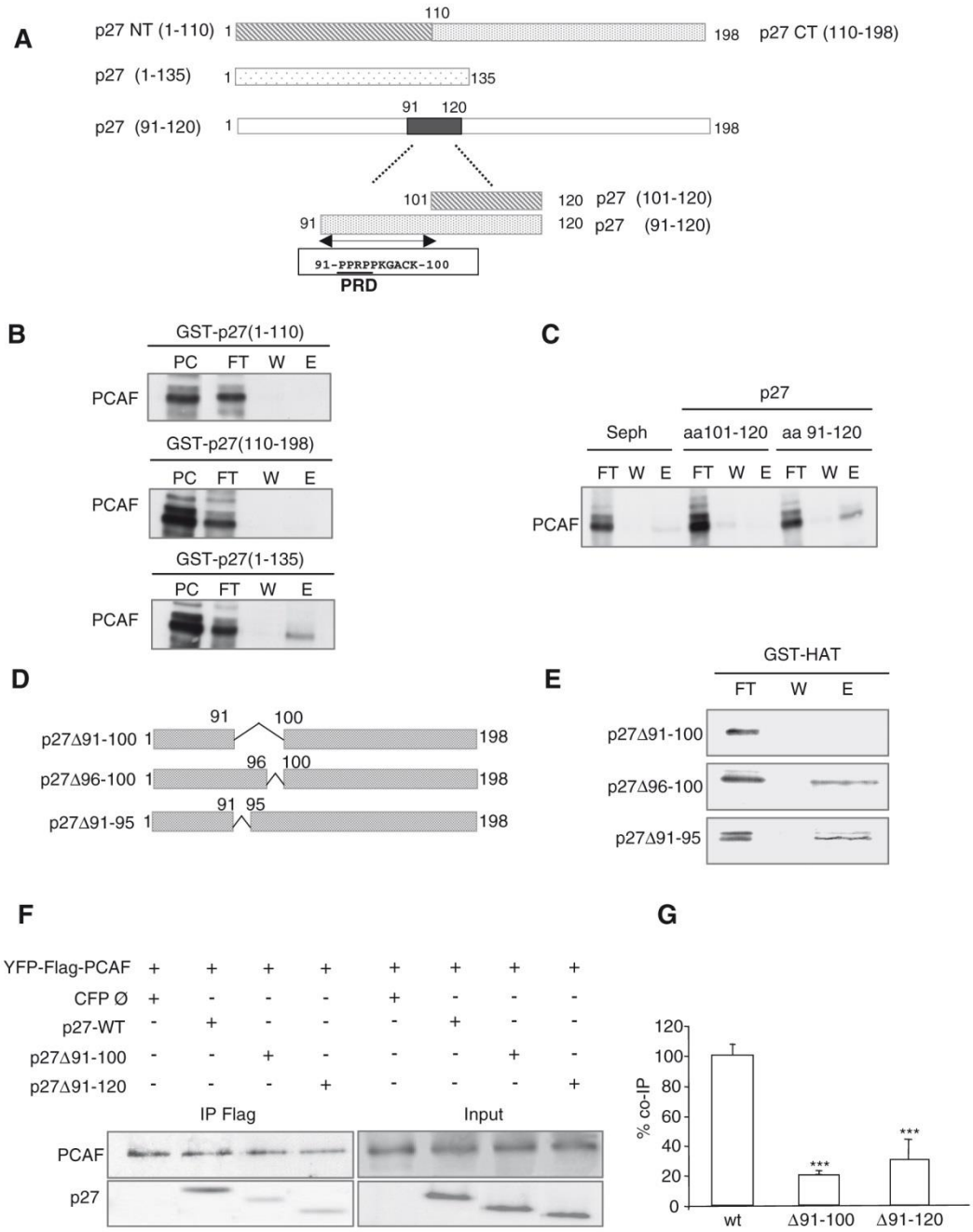


Figure 2. The PID of p27 includes amino acids 91–120. (**A**) Graphic showing different fragments and domains of p27 used in the experiments. (**B**) Purified PCAF was loaded on GST–p27(1–110), GST–p27(110–198) and GST–p27(1–135) affinity chromatography columns. Then, the input (PC), the flow trough (FT), the last wash (W) and the eluate (E) fractions were subjected to electrophoresis and visualized by WB. (**C**) Purified PCAF was loaded on p27(101–120) and p27(91–120) affinity chromatography columns. As a control a Sepharose 4B column (Seph.) was used. Then, the flow trough (FT), the last wash (W) and the eluate (E) fractions were subjected to electrophoresis and visualized by WB. (**D**) Graphic showing the three p27 deletion mutants used in the experiments. (**E**) Purified p27(Δ91–100), p27(Δ96–100) and p27(Δ91–95) proteins were loaded on a GST–HAT column. Then, the flow trough (FT), the last wash (W) and the eluate (E) fractions were subjected to electrophoresis and visualized by WB. (**F**) HEK293T cells were transfected with YFP–Flag–PCAF plus p27WT or plus the deletion mutants p27(Δ91-100) or p27(Δ91–120) or woth an empty CFP vector (Ø). Then, cell extracts were subjected to IP with anti-Flag and the immunoprecipitates analyzed by WB with anti-p27 and anti-PCAF. (**G**) Experiment in (F) was repeated three times and quantified. Results were expressed as the mean value ± SD. Statistical analyses were performed using Student's two-tailed paired *t*-test. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant. ***$P < 0.001$.

PUBLICACIÓ

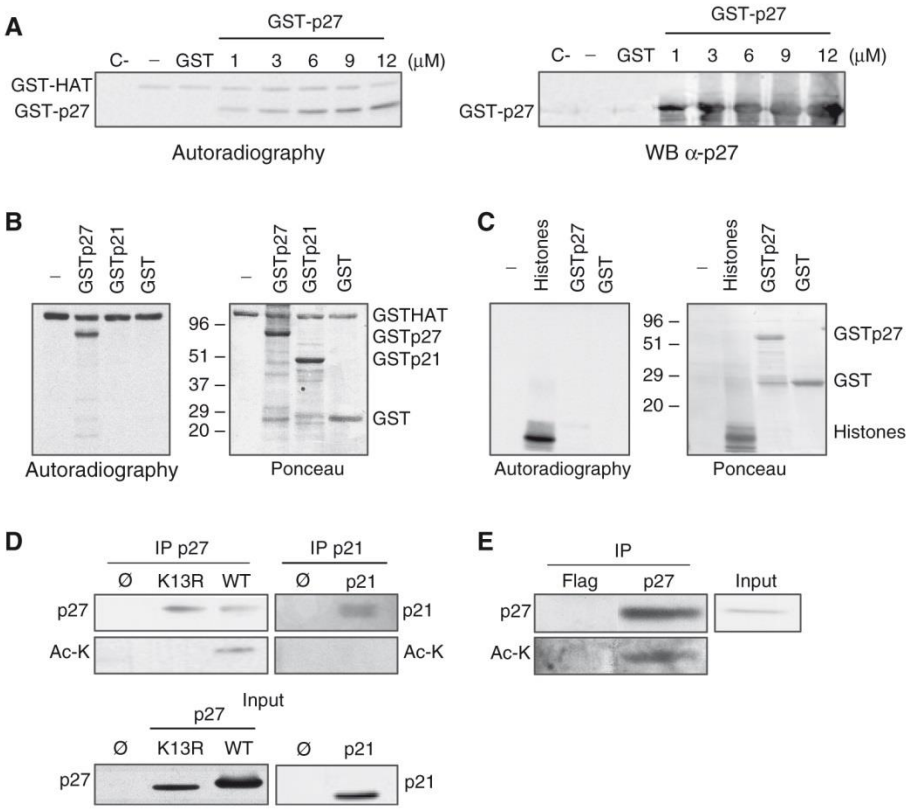


Figure 3. PCAF acetylates p27. (**A**) *In vitro* acetylation assays were performed by incubating purified GST–HAT with the indicated concentrations of purified GST–p27 in the presence of radioactive acetyl-CoA. Control assays were performed with GST–p27 in the absence of GST–HAT (C–), with GST–HAT in the absence of any substrate (–) or in the presence of GST. Acetylation was examined by autoradiography (left panel). A WB using anti-p27 is also showed (right panel). (**B**) Purified GST–HAT was incubated with GST–p27, GST–p21 or GST in the presence of radioactive acetyl-CoA. A similar assay was performed in the absence of any substrate (–). Acetylation was examined by autoradiography (left panel). Red Ponceau stain of the membrane is showed in the right panel. (**C**) Purified GST–CBP was incubated with GST–p27, GST or histones in the presence of radioactive acetyl-CoA. A similar assay was performed in the absence of any substrate (–). Acetylation was examined by autoradiography (left panel). Red Ponceau stain of the membrane is shown in the right panel. (**D**) HEK293T cells were cotransfected with PCAF plus p27WT or p27K13R, or transfected with an empty vector (ø). Then, cell extracts were subjected to IP with anti-p27. The levels of total or acetylated p27 were examined by WB with anti-p27 or anti-acetyl-lysine antibodies (Ac-K), respectively (upper left panel). A similar experiment was performed using p21 instead of p27 (upper right panel). Expression levels of p27 and p21 were examined by WB (bottom panels). (**E**) Cell extracts were subjected to IP with anti-p27 or anti-Flag (used as a control) and then the immunoprecipitates were analyzed by anti-p27 and anti-acetyl-Lysine antibodies (Ac-K).

determined by IP the association of p27 with PCAF at different times after serum addition. As shown in Figure 5D the association between both proteins was similar in quiescent cells and at different times after proliferative activation. Finally, by IP with anti-p27 followed by WB with anti-acetyl-lysine we determined the acetylation of p27 during cell cycle. Results revealed that p27 was slightly acetylated in quiescent cells (0 h) and then acetylation fluctuates: at 2 h it was significantly increased whereas later on at 4–6 h decreased to subsequently recuperate the initial levels of acetylation (Figure 5E). Data from three different experiments were quantified and represented in Figure 5F.

Acetylation of Lysine K100 regulates the Stability of p27

On comparing the kinetics of p27 levels (Figure 5C) and p27 acetylation (Figure 5F), we observed a correlation between both parameters during the first 6 h after serum addition to the cell cultures. Thus, we aimed to study whether acetylation of p27 could play a role on its stability. As shown in Figure 6A, knocking down of PCAF, in HCT116 cells, by a specific shRNA induced a significant increase of p27. Conversely, overexpression of Flag–PCAF induced a significant decrease of p27. Similar results were observed when cells overexpressed an active fragment of PCAF (GFP-CtWT). This decrease of p27 depended on the activity of PCAF because overexpression of an inactive form (GFP-CtΔHAT) did not significantly affect the levels of p27 (Figure 6B). These results suggested that PCAF could regulate the stability of p27. To further analyze this possibility, we determined the half-life of p27 in HCT116 cells overexpressing PCAF. Results revealed that the half-life of p27 in these cells was significantly decreased (1.1 ± 0.2 h) as compared to control cells

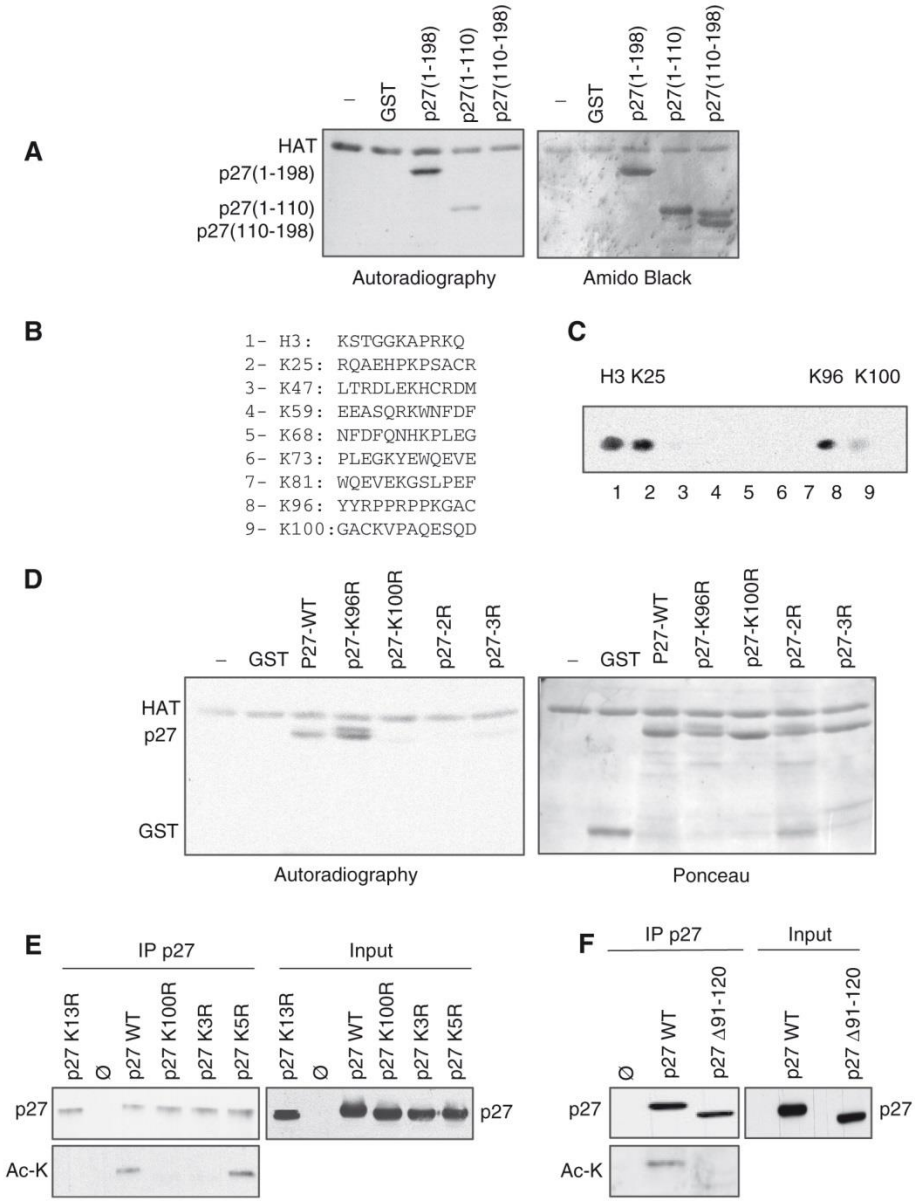


Figure 4. PCAF acetylates Lys100 of p27. (**A**) Purified GST–HAT was incubated with GST, full-length GST–p27, GST–p27(1–110) or GST–p27(110–198), in the presence of radioactive acetyl-CoA. A similar assay was performed in the absence of any substrate (–). Acetylation was examined by autoradiography (left panel). Amido black stain of the membrane is showed in the right panel. (**B**) Amino acid sequences of peptides used for the identification of the *in vitro* acetylation sites of p27 by spot mapping analysis. Eight peptides, each one containing one of the lysines present in the N-moiety of p27, were spotted on a nitrocellulose membrane (peptides 2–9). A peptide from histone H3 was also spotted and used as a positive control (peptide 1). (**C**) The membrane containing the spotted peptides was subjected to an *in vitro* acetylation assay using GST–HAT as acetylase. Acetylation was examined by autoradiography. (**D**) Purified GST–HAT was incubated with GST, GST–p27WT, GST–p27–K96R, GST–p27–K100R, GSTp27–K96R,K100R (GST–p27-2R) or GST–p27–K25R,K96R,K100R (GST–p27–3R) in the presence of radioactive acetyl-CoA. A similar assay was performed in the absence of any substrate (–). Acetylation was examined by autoradiography (left panel). Red Pounceau staining of the membrane is showed in the right panel. (**E**) HEK293T cells were transfected with an empty vector (ø) or cotransfected with p27WT, p27-K13R, p27-K100R, p27-K3R or p27-K5R plus PCAF. Cell extracts were then subjected to IP with anti-p27 and the total levels of p27 or acetylated p27 were analyzed by WB with anti-p27 or anti acetyl-Lysine (Ac-K) antibodies (left panel). Expression levels of the different forms of p27 were determined by WB with anti-p27 (right panel). (**F**) Cells were transfected with an empty vector or cotransfected with p27WT or p27(Δ91–120) plus PCAF. Cell extracts were then subjected to IP with anti-p27 and the levels of p27 or acetylated p27 were analyzed by WB with anti-p27 or anti-acetyl-Lysine (Ac-K) antibodies (left panel). Expression levels of the different forms of p27 were determined by WB with anti-p27 (right panel).

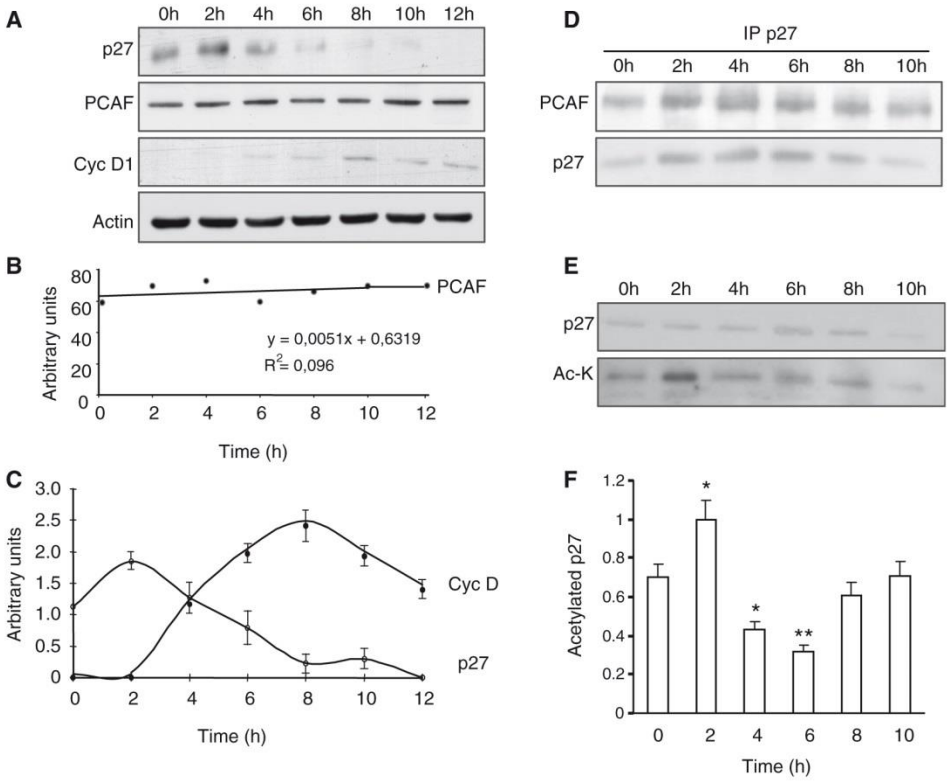


Figure 5. The p27 protein is acetylated at early G_1. (**A**) HeLa cells were made quiescent by serum starvation for 72 h and then re-plated in the presence of 10% FCS. Total cell extracts were prepared at the indicated times after cell-cycle resumption. The levels of PCAF and p27 were examined by WB with anti-PCAF and anti-p27. WB with anti-cyclin D1 was performed to monitor cell-cycle progression and WB with anti-actin was performed as a loading control. (**B**) PCAF levels from three different experiments described in (A) were quantified and expressed as a regression line. (**C**) cyclin D1 and p27 levels from three different experiments described in (A) were quantified and expressed as the mean value ± SD. (**D**) HeLa cell extracts from the indicated times were subjected to IP with anti-p27 and the levels of PCAF and p27 in the immunoprecipitates were determined by WB. (**E**) Extracts from HeLa cells at different times after cell-cycle resumption were subjected to IP with anti-p27. Then, the levels of p27 and those of acetylated p27 in the immunoprecipitates were assessed by WB with anti- p27 or with anti-acetyl-lysine (Ac-K), respectively. (**F**) The acetylation levels of p27 from three different experiments described in (E) were quantified and expressed as the mean value ± SD. Statistical analyses were performed using Student's two-tailed paired *t*-test. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$.

(3.3 ± 0.4 h), thereby confirming the effect of PCAF on the downregulation of p27 (Figure 6C and D). We also observed that the half-life of the ectopically expressed non-acetylatable mutant p27-K100R was much higher (12.4 ± 0.5 h) than that of the endogenous (1.8 ± 0.2 h) or ectopic p27WT (1.9 ± 0.3 h) (Figure 6E and F), indicating that Lys100 was necessary for the acetylation and stability of p27

We subsequently analyzed the behavior of ectopic p27WT and p27K100R during cell cycle. HCT116 cells transfected with each one of these forms of p27 were made quiescent by culturing them with 0.5% FCS-containing media during 48 h. Then, they were re-plated and cultured with 10% FCS to induce cell-cycle entry. Cells were then collected at 10 h after serum addition. In these experiments cyclin D1 levels were determined to monitor cell-cycle progression and those of actin as a loading control. As shown in Figure 7A, at 10 h after proliferative activation, the levels of p27WT were decreased whereas those of p27K100R remained similar to the control. These results corroborate that the non-acetylatable mutant of p27 was more stable than p27WT at G_1. Similar experiments were performed using the mutant p27(Δ91–120) unable to interact with PCAF and also non-acetylatable. In this case, we also observed that at G_1, this mutant was more stable than p27WT.

To analyze whether the effect of PCAF on the stability of p27 was depending on proteasome activity, we added ALLNL or MG132, specific inhibitors of the 26 S proteasome, to HCT116 cell cultures previously transfected with Flag–PCAF and then, we checked the levels of p27 protein. Results revealed that in the presence of any of both proteasome inhibitors, the overexpression of PCAF did not decrease the levels of p27 (Figure 7C and D).

We subsequently studied the effect of PCAF on p27 ubiquitylation. Thus, we performed an *in vitro* ubiquitylation assay using reticulocyte extracts and purified $p27^{Kip1}$ protein in the presence or in the absence

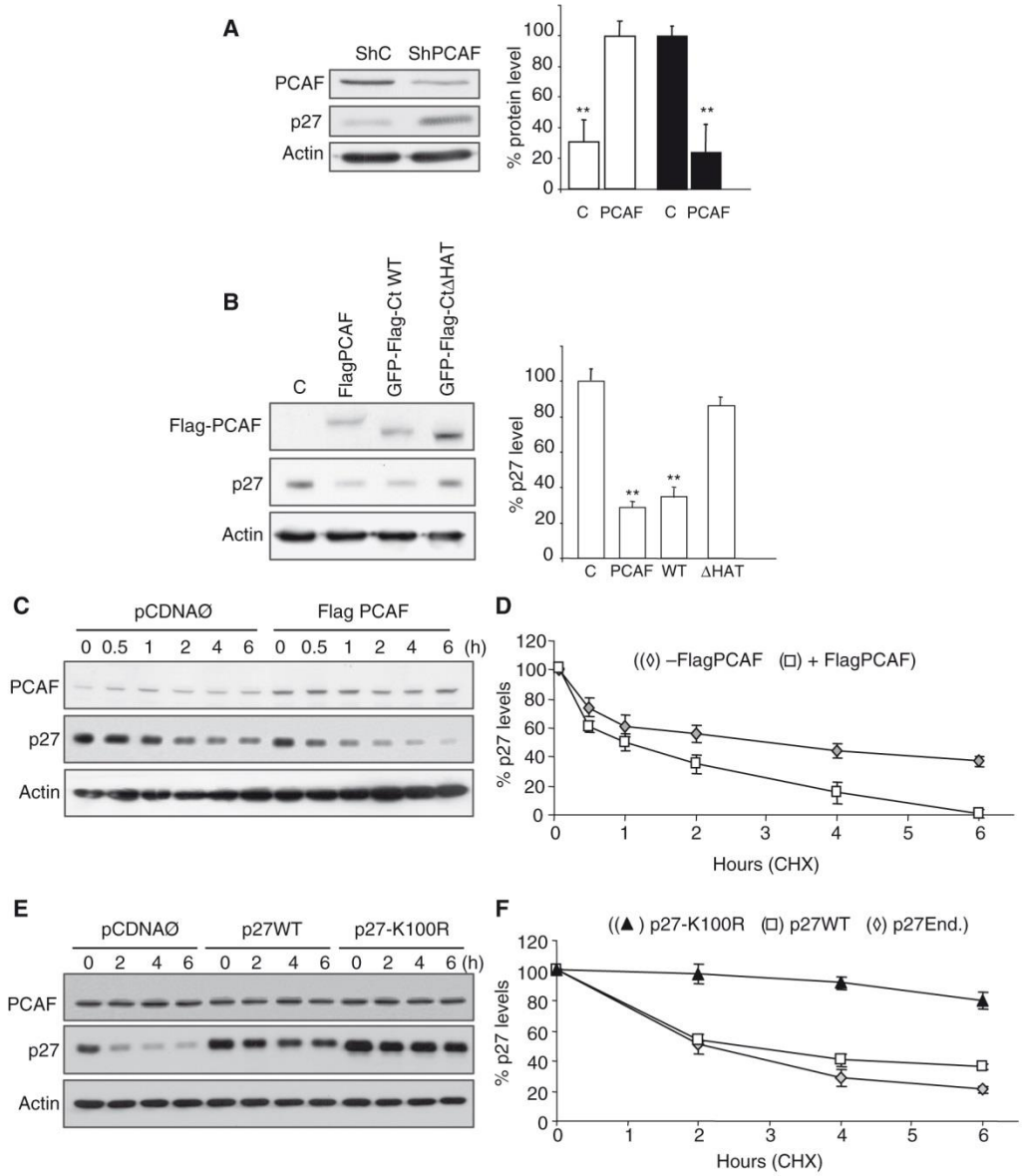


Figure 6. PCAF induces p27 degradation. (**A**) HCT116 cells were knocked down for PCAF by using a specific shRNA whereas an unrelated shRNA was used as a control (shC). Then, the levels of PCAF and p27 were determined by WB with anti-PCAF and anti-p27. WB with anti-actin was used as a loading control (left panel). Results from three different experiments were quantified and expressed as the mean value ± SD. Statistical analyses were performed using Student's two-tailed paired *t*-test. $^{**}P < 0.01$ (right panel). (**B**) HCT116 cells were transfected with expression vectors for GFP (C), Flag–PCAF, GFP-Flag-CtWT or for its inactive form GFP-Flag-CtΔHAT. At 24 h post-transfection, the levels of p27 and the ectopic Flag–PCAF were examined by WB with anti-p27 or anti-Flag, respectively. WB with anti-actin was performed as a loading control (left panel). Results from three different experiments were quantified and expressed as the mean value ± SD. Statistical analyses were performed using Student's two-tailed paired *t*-test. $^{**}P < 0.01$ (right panel). (**C**) HCT116 cells were transfected with Flag–PCAF or with an empty vector (Ø) as a control. At 24 h post-transfection, cycloheximide (CHX) was added to the cell cultures and then, at the indicated times the levels of PCAF and p27 were examined by WB with an anti-PCAF or anti-p27, respectively. WB with anti-actin was performed as a loading control. (**D**) The intensities of p27 signals from three independent experiments were quantified, normalized for actin and plotted. Results are expressed as percentage relative to levels observed at Time 0. Statistical analyses were performed using Student's two-tailed paired *t*-test. In all points $P < 0.05$. (**E**) HCT116 cells were transfected with p27WT or p27-K100R. Transfection with the empty vector (Ø) was used as a control. At 24 h post-transfection, CHX was added to the cell cultures and then, at the indicated times the levels of endogenous PCAF and ectopic p27WT or p27-K100R were examined by WB with anti-PCAF or anti-p27, respectively. WB with anti-actin was performed as a loading control. (**F**) The intensities of p27 signals from three independent experiments were quantified, normalized for actin and plotted. Results are expressed as percentage relative to levels observed at Time 0. Statistical analyses were performed using Student's two-tailed paired *t*-test. In all points, when comparing ectopic p27WT or endogenous p27 versus p27K100R, $P < 0.01$.

PUBLICACIÓ

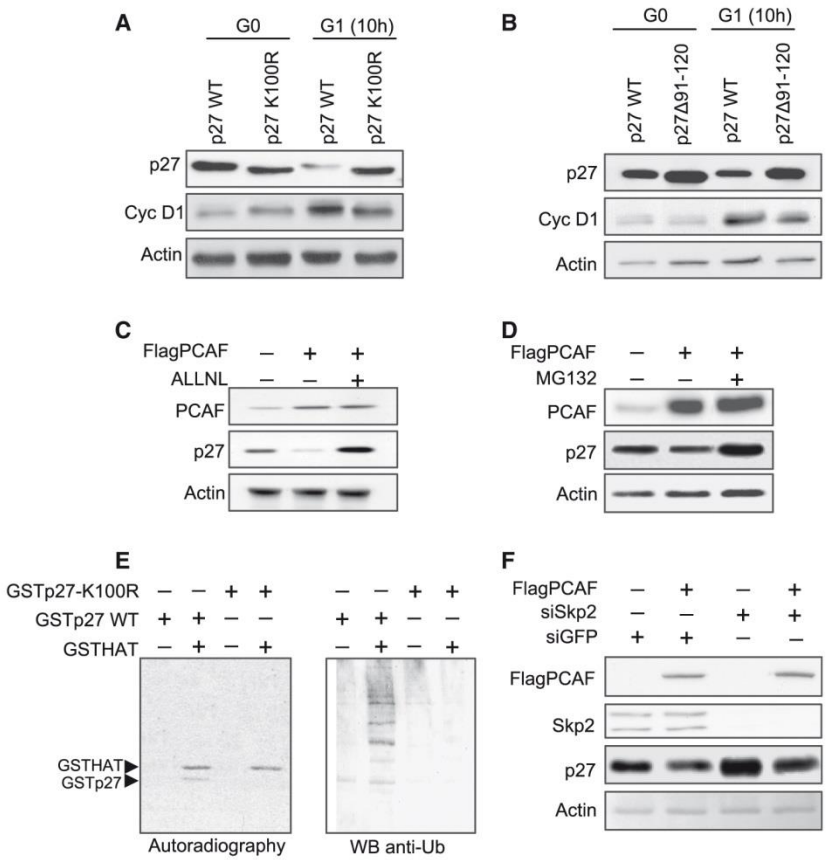


Figure 7. Acetylation of K100 in p27 induces its degradation via proteasome. (**A**) HCT116 cells were transfected with GFPp27WT or GFPp27K100R and then made quiescent by serum starvation for 48 h. Then, they were released from quiescence by serum addition. Cell samples were collected at Time 0 and at 10 h after re-entry into cell cycle. The levels of these two forms of p27 were detected by WB using anti-GFP. Cyclin D1 was detected by WB to monitor cell-cycle progression and WB with anti-actin was performed as a loading control. (**B**) HCT116 cells were transfected with GFPp27WT or GFPp27Δ91–120 and then made quiescent by serum starvation for 48 h. Then, they were released from quiescence by serum addition. Cell samples were collected at Time 0 and at 10 h after re-entry into cell cycle. The levels of these two forms of p27 were detected by WB using anti-GFP. Cyclin D1 was detected by WB to monitor cell-cycle progression and WB with anti-actin was performed as a loading control. (**C**) HCT116 cells were transfected with Flag–PCAF or with the empty vector as a control. At 8 h post-transfection, cells were additionally incubated for 16 h in the presence or in the absence of the proteasome inhibitor ALLN. Then, the levels of PCAF and p27 in the total cell extracts were examined by WB. WB with anti-actin was performed as a loading control. (**D**) HCT116 cells were transfected with Flag–PCAF or with the empty vector as a control. At 8 h post-transfection, cells were additionally incubated for 16 h in the presence or in the absence of the proteasome inhibitor MG132. Then, the levels of PCAF and p27 in the total cell extracts were examined by WB. WB with anti-actin was performed as a loading control. (**E**) PCAF stimulates the *in vitro* ubiquitylation of p27. Purified recombinant GSTp27WT or GSTp27-K100R proteins were incubated with radioactive acetyl-CoA and GSTHAT protein for *in vitro* acetylation reaction in the presence of reticulocyte lysates. After incubation, the proteins from the reticulocyte lysates were eliminated by purifying the GST-containing proteins with a glutathione column. The 50% of the material was analyzed for ubiquitylation by WB with anti-ubiquitin antibody (right panel). The other 50% of the material was used for the analysis of the acetylation of p27 by autoradiography (left panel). (**F**) The levels of endogenous Skp2 were down-regulated by incubating HCT116 cells with siRNA for Skp2 (siSkp2) during 48 h. Incubation with siRNA for GFP (siGFP) was used as a control. Then, cells were transfected with FlagPCAF expression vector. At 20 h post-transfection, the levels of Flag PCAF, Skp2, p27 and actin were determined in the cell extracts by WB using specific antibodies.

of active PCAF. Results revealed that acetylation by PCAF induced the ubiquitylation of p27 (Figure 7E). This ubiquitylation depends on Lys100 residue in p27 because the mutant p27-K100R was not ubiquitylated in the same experimental conditions (Figure 7E). Finally, we studied whether degradation of p27 induced by PCAF was mediated by Skp2, an F-box protein involved in the recognition of p27 facilitating its ubiquitylation by the SCF^{Skp2} complex (25). Thus, HCT116 cells were treated with siRNA for Skp2 and then transfected with FlagPCAF. Results indicated that the treatment with siRNA reduced Skp2 and increased the levels of p27 (Figure 7F, lanes 1 and 3). We also observed that the overexpression of PCAF decreased the levels of $p27^{Kip1}$ in cells with normal amounts of Skp2, but also in cells with low levels of this protein, indicating that degradation of p27 induced by PCAF is independent of Skp2 (Figure 7F, lanes 2 and 4).

DISCUSSION

Here we investigated the role of acetylation on p27 stability. We describe that p27 directly interacts with PCAF forming complexes in the cells, mostly located in the nucleus. This is consistent with previous reports showing that PCAF essentially displays a nuclear localization (26). We provide evidence that p27 associates with the catalytic domain (HAT) of PCAF through a region including amino acids 91–120 that we named PID. Despite the deletion p27 mutant, lacking a region including amino acids 91–100 loses the ability to interact with PCAF (Figure 2E), the fact that PCAF did no interact with the p27NT(1–110) fragment indicates that the domain amino acids 110–120 is also necessary for the interaction and thus the full PID of p27 has to considered to include amino acids 91–120.

Interestingly, this region contains a PRD (amino acids 91–95) known to interact with proteins containing a Src homology 3 (SH3) domain. The PRD of p27 has been reported to interact with other proteins that are relevant for cell-cycle control as for instance Grb2 (27). These data are in agreement with previous observations showing that the HAT domain of GNC5, an acetyltransferase presenting high homology with PCAF, has a structure similar to an SH3 domain (28,29). Due to this high homology, it can be assumed that PCAF also has this structure that would facilitate the association with the PRD of p27. However, as shown in Figure 2E the interaction of PCAF with this domain of p27 is not critical because when it was deleted the association of PCAF with p27 was only slightly affected.

We further confirmed that the PID domain of p27 includes amino acids 91–120 by transfecting the deletion mutants p27(Δ91–100) or p27(Δ91–120) into the cells and analyzing their interaction with PCAF. As shown in Figure 2F and G, the interaction of PCAF with these mutants was strongly reduced. The residual interaction of PCAF with these mutants can be attributed to the indirect interaction through cyclin A–cdk2 complexes. We previously reported that PCAF directly interacts with both cyclin A and cdk2 (6,30). Since these p27 mutants (p27Δ91–100 and p27Δ91–120) still retain the ability to associate with cyclins and cdks, the IP with anti-Flag immunoprecipitate the cyclin A and cdk2 associated with PCAF and additionally the p27 associated with cyclin A and cdk2.

We identified K100 as the specific residue of p27 acetylated by PCAF *in vitro* and in the cells. K100 is very close to the PRD (amino acids 91–95) and it is included in the PID of p27. Thus, this is consistent with a scenario in which PCAF through its HAT domain associates with the PID of p27 and acetylates K100 included in this region.

Degradation of p27 is produced by ubiquitin-dependent proteolysis in a two-step process (31). The first step takes place during G_0/G_1 transition and early-mid G_1, is independent of phosphorylation at T187 of p27 and it is mediated by the ubiquitin ligase KPC (32,33). However, the molecular signal triggering this degradation still remains unclear.

In contrast, the second proteolytic step is produced during G_1/S transition and S and G_2 phases and it is dependent on phosphorylation at T187 by cyclin E–Cdk2 (34,35). This second step is preceded by the phosphorylation of p27 at three specific tyrosine residues: Y74, Y88 and Y89. This allows to the p27-associated cyclin E–Cdk2 complexes to be partially activated. Then, these complexes can phosphorylate the T187 of p27 inducing its ubiquitin-dependent degradation (36,37). Interestingly, these tyrosine residues are very close to the PRD of p27. Moreover, the tyrosine kinases, members of the Src family (i.e. c-Src, Bcr-Abl, Lyn) that phosphorylate these p27 tyrosine residues have an SH3 domain that allows the interaction with the PRD of p27 (38–41). Collectively, these results indicate a key participation of the PID (a region including amino acids 91–120) of p27 in the regulation of its stability: by associating with PCAF and acetylating K100 and by interacting with tyrosine kinases that phosphorylate Y74, Y88 and/or Y89 thus allowing the further phosphorylation of T187.

We propose that degradation of p27 mediated by acetylation could operate during G_1. We observed that the knockdown of PCAF increases the levels of p27 and conversely overexpression of PCAF decreases its amount. Moreover, we also observed that the half-life of p27 is decreased when PCAF is overexpressed and than that of the non-acetylatable mutant p27K100R is higher than that of p27WT. Moreover, as shown in Figure 7, we observed that differently to p27WT, the non-acetylatable mutants p27K100R and p27Δ91–120 were not degraded during G1.

We also report here several evidences indicating that the acetylation induced p27 degradation could be performed via proteasome. Specifically, we describe that proteasome inhibitors as ALLN and MG132 block the p27 degradation induced by PCAF overexpression and that p27 acetylation by PCAF induced its K100 dependent ubiquitylation, because the non-acetylatable p27K100R mutant was not ubiquitylated under the same experimental conditions (Figure 7E). The observation that the levels of acetylated p27 correlates with the levels of p27 during the first 6 h after mitogenic stimulation of the cells (Figure 5C and F) also supports the relationship between acetylation and degradation during G1. These results indicate that there is a basal acetylation of p27 in quiescent cells. A possibility is that this basal acetylation could be related to a basal turn over of the protein in the nucleus. At 2 h an increase of p27 acetylation was observed by WB. Interestingly, at this point the levels of p27 are still high (Figure 5C). This indicates that at this point degradation still has not been initiated and suggests that p27 is already targeted for its subsequent degradation that will immediately start. This is supported by the fact that at times 4–6 h the total levels of p27 are progressive decreasing concomitantly with the decrease of acetylated p27. This indicates that specifically is the acetylated form of p27 the one that is degraded at that time. Finally, at times 8–10 h the subsequent degradation of p27 is probably performed via phosphorylation of T187 via Skp2 that is produced later on at the late G1 and G1/S

PUBLICACIÓ

transition. At this point acetylation of p27 returns to its basal levels.

Interestingly, we also report here that the acetylation dependent degradation of p27 is independent of Skp2 (Figure 7F). These data also support the role of acetylation induced degradation of p27 during G1. Finally, it has been reported that a domain of p27 including amino acids 42–102 is necessary for the ubiquitylation and degradation of p27 mediated by the E-ubiquitin ligase KPC at G_0/G_1 (33). Our results indicating that K100 is included in this domain are compatible with the possibility that acetylation could signal p27 for recognition by KPC at G_0/G_1. Another mechanism involved in the degradation of p27 during G_1 related to the activation of the Wnt–Cul4A pathway has been reported (42). However, the possibility that acetylation of p27 could participate in this mechanism remains to be explored.

The functional relevance of p27 acetylation on its role on transcription still remains to be explored. However, because p27 is a transcriptional repressor of its target genes, our data showing that acetylation at K100 by PCAF induces its degradation allows us to speculate that it would facilitate the expression of the p27-TGs. This speculation is compatible with the well-known role of PCAF as a transcriptional coactivator. Experiments to clarify this point are currently underway in our laboratory.

We also speculate that this new mechanism regulating p27 stability could be also relevant during oncogenesis. It is known that p27 is decreased in many human tumors correlating with a bad prognosis (43,44). In a number of cases, this decrease has been correlated with increased levels of Skp2 that mediates p27 degradation at S/G_2. However, in other cases, this correlation could not be established. Results reported here allow us to speculate that the decrease of p27 levels in tumor cells could be also produced by alterations in its acetylation status.

In conclusion, we describe here a new mechanism regulating p27 stability that involves acetylation of K100 of p27. We postulate that this new mechanism could be relevant for the transcriptional regulatory role of p27.

FUNDING

The Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain [SAF 2006-05212 and SAF 2009-07769 to O.B.] and [BFU2006-01493, CSD2006-00049 and BFU2009-11527 to M.A.M.B.]; the Instituto de Salud Carlos III: RETICS [RD06/0020/0010 to O.B.]; Generalitat de Catalunya [SGR 09-1382 to O.B.]. Funding for open access charge: Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain [SAF 2009-07769].

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

1. Morgan,D.O. (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **13**, 261–291.
2. Malumbres,M. and Barbacid,M. (2005) Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem. Sci.*, **30**, 630–641.
3. Paternot,S., Bockstaele,L., Bisteau,X., Kooken,H., Coulonval,K. and Roger,P.P. (2010) Rb inactivation in cell cycle and cancer: the puzzle of highly regulated activating phosphorylation of CDK4 versus constitutively active CDK-activating kinase. *Cell Cycle*, **9**, 689–699.
4. Blais,A. and Dynlacht,B.D. (2007) E2F-associated chromatin modifiers and cell cycle control. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **19**, 658–662.
5. Besson,A., Dowdy,S.F. and Roberts,J.M. (2008) CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev. Cell*, **14**, 159–169.
6. Mateo,F., Vidal-Laliena,M., Canela,N., Zecchin,A., Martinez-Balbas,M., Agell,N., Giacca,M., Pujol,M.J. and Bachs,O. (2009) The transcriptional co-activator PCAF regulates cdk2 activity. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 7072–7084.
7. Echalier,A., Endicott,J.A. and Noble,M.E. (2010) Recent developments in cyclin-dependent kinase biochemical and structural studies. *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, 511–519.
8. Sherr,C.J. and Roberts,J.M. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.*, **13**, 1501–1512.
9. Porter,P.L., Malone,K.E., Heagerty,P.J., Alexander,G.M., Gatti,L.A., Firpo,E.J., Daling,J.R. and Roberts,J.M. (1997) Expression of cell-cycle regulators p27Kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nat. Med.*, **3**, 222–225.
10. Chu,I.M., Hengst,L. and Slingerland,J.M. (2008) The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, **8**, 253–267.
11. Slingerland,J. and Pagano,M. (2000) Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J. Cell Physiol.*, **183**, 10–17.
12. Pagano,M., Tam,S.W., Theodoras,A.M., Beer-Romero,P., Del Sal,G., Chau,V., Yew,P.R., Draetta,G.F. and Rolfe,M. (1995) Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science*, **269**, 682–685.
13. Catzavelos,C., Bhattacharya,N., Ung,Y.C., Wilson,J.A., Roncari,L., Sandhu,C., Shaw,P., Yeger,H., Morava-Protzner,I., Kapusta,L. *et al.* (1997) Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat. Med.*, **3**, 227–230.
14. Belletti,B., Nicoloso,M.S., Schiappacassi,M., Chimienti,E., Berton,S., Lovat,F., Colombatti,A. and Baldassarre,G. (2005) p27(kip1) functional regulation in human cancer: a potential target for therapeutic designs. *Curr. Med. Chem.*, **12**, 1589–1605.
15. Fero,M.L., Rivkin,M., Tasch,M., Porter,P., Carow,C.E., Firpo,E., Polyak,K., Tsai,L.H., Broudy,V., Perlmutter,R.M. *et al.* (1996) A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell*, **85**, 733–744.
16. Kiyokawa,H., Kineman,R.D., Manova-Todorova,K.O., Soares,V.C., Hoffman,E.S., Ono,M., Khanam,D., Hayday,A.C., Frohman,L.A. and Koff,A. (1996) Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell*, **85**, 721–732.
17. Fero,M.L., Randel,E., Gurley,K.E., Roberts,J.M. and Kemp,C.J. (1998) The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature*, **396**, 177–180.
18. Besson,A., Hwang,H.C., Cicero,S., Donovan,S.L., Gurian-West,M., Johnson,D., Clurman,B.E., Dyer,M.A. and Roberts,J.M. (2007) Discovery of an oncogenic activity in p27Kip1 that causes stem cell expansion and a multiple tumor phenotype. *Genes Dev.*, **21**, 1731–1746.
19. Pippa,R., Espinosa,L., Gundem,G., Garcia-Escudero,R., Dominguez,A., Orlando,S., Gallastegui,E., Saiz,C., Besson,A., Pujol,M.J. *et al.* (2011) p27(Kip1) represses transcription by direct interaction with p130/E2F4 at the promoters of target genes. *Oncogene*, December 19 (doi:10.1038/onc.2011.582; epub ahead of print).
20. Santos-Rosa,H., Valls,E., Kouzarides,T. and Martinez-Balbas,M. (2003) Mechanisms of P/CAF auto-acetylation. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 4285–4292.
21. Estanyol,J.M., Jaumot,M., Casanovas,O., Rodriguez-Vilarrupla,A., Agell,N. and Bachs,O. (1999) The protein SET

regulates the inhibitory effect of p21(Cip1) on cyclin E-cyclin-dependent kinase 2 activity. *J. Biol. Chem.*, **274**, 33161–33165.
22. Martinez-Balbas,M.A., Bannister,A.J., Martin,K., Haus-Seuffert,P., Meisterernst,M. and Kouzarides,T. (1998) The acetyltransferase activity of CBP stimulates transcription. *EMBO J.*, **17**, 2886–2893.
23. Bannister,A.J. and Kouzarides,T. (1996) The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature*, **384**, 641–643.
24. Canela,N., Rodriguez-Vilarrupla,A., Estanyol,J.M., Diaz,C., Pujol,M.J., Agell,N. and Bachs,O. (2003) The SET protein regulates G2/M transition by modulating cyclin B-cyclin-dependent kinase 1 activity. *J. Biol. Chem.*, **278**, 1158–1164.
25. Kossatz,U., Dietrich,N., Zender,L., Buer,J., Manns,M.P. and Malek,N.P. (2004) Skp2-dependent degradation of p27kip1 is essential for cell cycle progression. *Genes Dev.*, **18**, 2602–2607.
26. Blanco-Garcia,N., Asensio-Juan,E., de la Cruz,X. and Martinez-Balbas,M.A. (2009) Autoacetylation regulates P/CAF nuclear localization. *J. Biol. Chem.*, **284**, 1343–1352.
27. Sugiyama,Y., Tomoda,K., Tanaka,T., Arata,Y., Yoneda-Kato,N. and Kato,J. (2001) Direct binding of the signal-transducing adaptor Grb2 facilitates down-regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. *J. Biol. Chem.*, **276**, 12084–12090.
28. Poux,A.N., Cebrat,M., Kim,C.M., Cole,P.A. and Marmorstein,R. (2002) Structure of the GCN5 histone acetyltransferase bound to a bisubstrate inhibitor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 14065–14070.
29. Schuetz,A., Bernstein,G., Dong,A., Antoshenko,T., Wu,H., Loppnau,P., Bochkarev,A. and Plotnikov,A.N. (2007) Crystal structure of a binary complex between human GCN5 histone acetyltransferase domain and acetyl coenzyme A. *Proteins*, **68**, 403–407.
30. Mateo,F., Vidal-Laliena,M., Canela,N., Busino,L., Martinez-Balbas,M.A., Pagano,M., Agell,N. and Bachs,O. (2009) Degradation of cyclin A is regulated by acetylation. *Oncogene*, **28**, 2654–2666.
31. Nakayama,K.I. and Nakayama,K. (2005) Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **16**, 323–333.
32. Kamura,T., Hara,T., Matsumoto,M., Ishida,N., Okumura,F., Hatakeyama,S., Yoshida,M., Nakayama,K. and Nakayama,K.I. (2004) Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1) at G1 phase. *Nat. Cell Biol.*, **6**, 1229–1235.
33. Kotoshiba,S., Kamura,T., Hara,T., Ishida,N. and Nakayama,K.I. (2005) Molecular dissection of the interaction between p27 and Kip1 ubiquitylation-promoting complex, the ubiquitin ligase that regulates proteolysis of p27 in G1 phase. *J. Biol. Chem.*, **280**, 17694–17700.
34. Malek,N.P., Sundberg,H., McGrew,S., Nakayama,K., Kyriakides,T.R., Roberts,J.M. and Kyriakidis,T.R. (2001) A mouse knock-in model exposes sequential proteolytic pathways that regulate p27Kip1 in G1 and S phase. *Nature*, **413**, 323–327.
35. Hara,T., Kamura,T., Nakayama,K., Oshikawa,K., Hatakeyama,S. and Nakayama,K. (2001) Degradation of p27(Kip1) at the G(0)-G(1) transition mediated by a Skp2-independent ubiquitination pathway. *J. Biol. Chem.*, **276**, 48937–48943.
36. Grimmler,M., Wang,Y., Mund,T., Cilensek,Z., Keidel,E.M., Waddell,M.B., Jakel,H., Kullmann,M., Kriwacki,R.W. and Hengst,L. (2007) Cdk-inhibitory activity and stability of p27Kip1 are directly regulated by oncogenic tyrosine kinases. *Cell*, **128**, 269–280.
37. Chu,I., Sun,J., Arnaout,A., Kahn,H., Hanna,W., Narod,S., Sun,P., Tan,C.K., Hengst,L. and Slingerland,J. (2007) p27 phosphorylation by Src regulates inhibition of cyclin E-Cdk2. *Cell*, **128**, 281–294.
38. Mayer,B.J. (2001) SH3 domains: complexity in moderation. *J. Cell Sci.*, **114**, 1253–1263.
39. Borriello,A., Cucciolla,V., Oliva,A., Zappia,V. and Della,R.F. (2007) p27Kip1 metabolism: a fascinating labyrinth. *Cell Cycle*, **6**, 1053–1061.
40. Kinoshita,T., Miyano,N., Nakai,R., Yokota,K., Ishiguro,H. and Tada,T. (2008) Protein purification and preliminary crystallographic analysis of human Lyn tyrosine kinase. *Protein Expr. Purif.*, **58**, 318–324.
41. Vervoorts,J. and Luscher,B. (2008) Post-translational regulation of the tumor suppressor p27(KIP1). *Cell Mol. Life Sci.*, **65**, 3255–3264.
42. Miranda-Carboni,G.A., Krum,S.A., Yee,K., Nava,M., Deng,Q.E., Pervin,S., Collado-Hidalgo,A., Galic,Z., Zack,J.A., Nakayama,K. *et al.* (2008) A functional link between Wnt signaling and SKP2-independent p27 turnover in mammary tumors. *Genes Dev.*, **22**, 3121–3134.
43. Tsihlias,J., Kapusta,L. and Slingerland,J. (1999) The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. *Annu. Rev. Med.*, **50**, 401–423.
44. Blain,S.W., Scher,H.I., Cordon-Cardo,C. and Koff,A. (2003) p27 as a target for cancer therapeutics. *Cancer Cell*, **3**, 111–115.