

---

## Tesis doctoral

*Estudi de la ciclina atípica CCNI com a potencial activador de CDK6 en línies de càncer de mama*

**Núria Masip Sales**

---



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la licència [Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada 4.0 Internacional \(CC BY-NC-ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia [Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional \(CC BY-NC-ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

This doctoral thesis is licensed under the [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International \(CC BY-NC-ND 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)







**UNIVERSITAT INTERNACIONAL DE CATALUNYA**  
**FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT**

**ESTUDI DE LA CICLINA ATÍPICA CCNI COM A  
POTENCIAL ACTIVADOR DE CDK6 EN LÍNIES  
DE CÀNCER DE MAMA**

**Núria Masip Sales**

**2021**





**UNIVERSITAT INTERNACIONAL DE CATALUNYA**  
**FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT**

**ESTUDI DE LA CICLINA ATÍPICA CCNI COM A  
POTENCIAL ACTIVADOR DE CDK6 EN LÍNIES  
DE CÀNCER DE MAMA**

**Núria Masip Sales**

Memòria de la tesi doctoral presentada per Núria Masip Sales, per optar al títol de doctor per la Universitat Internacional de Catalunya.

Treball dirigit pel Dr. Josep Clotet Erra i co-dirigit per la Dra. Mariana Ponte Cardoso Ribeiro del Departament de Ciències Bàsiques de la Universitat Internacional de Catalunya.

Programa de Doctorat en Ciències de la Salut de la Universitat Internacional de Catalunya.

Sant Cugat del Vallès, 2021

**Dr. Josep Clotet Erra**

Director de tesi

**Dra. Mariana Ponte Cardoso Ribeiro**

Co-directora de tesi



*Scientia potentia est*

"El coneixement és poder"

Francis Bacon





## RESUM

Fa quasi 40 anys del descobriment de les ciclines, les proteïnes oscil·lants tradicionalment dividides en dos grups, "cicle cel·lular" i "ciclines transcripcionals", que duen a terme els seus rols juntament amb la seva parella ciclina dependent de cinases (CDKs). Des d'aleshores, s'han descrit varies parelles de CDK-ciclina, com per exemple el rol de la família ciclina D (CCND) com a única activadora de CDK6. Aquest complex és un dels més rellevants en la progressió del cicle cel·lular controlant la transició G<sub>1</sub>-S a través de la fosforilació de la proteïna de retinoblastoma (pRb) i el consegüent alliberament dels factors de transcripció E2F. Per aquest fet, CDK6 és la CDK diana farmacològica amb més èxit aplicada actualment a un gran nombre de càncers i, per tant, profunditzar en el coneixement sobre la biologia de CDK6 aportaria informació beneficiosa. Cal destacar, que la família de les ciclines s'ha estès per incloure altres proteïnes que presenten el característic domini *cyclin box* que determina la unió a CDK. Aquestes proteïnes, anomenades ciclines atípiques per les seves característiques estructurals distintives, quasi no estan caracteritzades i la seva parella CDK segueix sense ser coneguda. A partir d'un assaig previ del doble híbrid en llevat, el nostre grup va identificar 10 nous complexos CDK-ciclina atípics, entre ells el format per ciclina I (CCNI) i CDK6 en el qual es centra aquesta tesi. Primerament, s'ha confirmat la interacció entre CCNI i CDK6 i s'ha demostrat que el complex és actiu enfront pRb. La sobreexpressió de CCNI incrementa la proliferació de línies cel·lulars tumorals i el creixement tumoral *in vivo* en models xenògrafs de càncer de mama triple negatiu d'una manera similar a CCND1. I és més, l'acció proliferativa de CCNI pot ser anul·lada pel silenciament de CDK6 o el tractament amb palbociclib sostenint que CCNI actua a través de l'activació de CDK6. En línia amb aquests resultats, la sobreexpressió de CCNI s'ha correlacionat positivament amb una major expressió de gens regulats pel factor de transcripció E2F en un panell de línies cel·lulars de càncer i mostres de pacients de càncer de mama. En conclusió, aquesta tesi proposa a CCNI com un possible nou regulador de les vies d'activació de CDK6, enriquint la maquinària de control de la transició G<sub>1</sub>-S del cicle cel·lular.



## ABSTRACT

It is almost 40 years since the discovery of cyclins, the oscillating proteins has been traditionally divided into two groups, "cell cycle" and "transcriptional cyclins", which play pivotal roles with their partner cyclin-dependent kinases (CDKs). Since then, well-established couples of CDK/cyclins have been described. One good example is the role of cyclin D (CCND) as the unique activator of CDK6. The CDK6/CCND complex has been described as one of the most important complex in progression through the cell cycle, controlling G<sub>1</sub>/S transition through the phosphorylation of retinoblastoma protein and release of E2F transcription factors. Consequently, CDK6 is the most successfully druggable CDK, currently targeted in many cancers and all the efforts to deepen the knowledge on CDK6 biology should provide valuable information. Notably, the cyclin family has spanned to include several other proteins that present the characteristic "cyclin box" domain that determines CDK binding. These proteins, which have been named atypical cyclins considering their distinctive features, remain poorly characterized and a systematic study to identify their partner CDKs is still missing. From a previous yeast two-hybrid assay we identified 10 new complexes between atypical cyclins and different CDKs, including a complex between cyclin I (CCNI) and CDK6 on which this thesis focuses. First confirmed the interaction between CCNI and CDK6 and demonstrated the complex is active against retinoblastoma protein. CCNI overexpression increased the proliferation of several cancer cell lines and promoted a fast tumor growth *in vivo* on triple negative breast cancer xenograft models, similarly to CCND1. Importantly, this effect that was abrogated by CDK6 silencing or treatment with CDK4/6 inhibitors, as palbociclib. Finally, CCNI upregulation correlated with higher expression of genes regulated by E2F in large panels of cell lines and breast cancer patient samples. In conclusion, we unveil CCNI as a new cell cycle regulator at the pathways that activate CDK6, enriching the wiring of control during G<sub>1</sub>-S decision.



# ÍNDEX

---



<b>RESUM</b> .....	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>11</b>
<b>ABREVIACIONS</b> .....	<b>17</b>
<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>21</b>
1. EPIDIMIOLÒGIA DEL CÀNCER .....	23
1.1. Càncer de mama .....	23
1.2. Càncer de pulmó .....	23
1.3. Càncer colorectal .....	24
2. CICLE CEL·LULAR .....	24
2.1. Principals vies de senyalització del cicle cel·lular .....	25
2.2. Regulació transcripcional del cicle cel·lular .....	26
3. CDKs, CICLINES I ALTRES REGULADORS .....	29
3.1. CDKs .....	29
3.2. Ciclines .....	30
3.3. Complexes CDK-ciclina .....	32
3.4. Regulació de l'activitat dels complexos CDK-ciclina .....	33
3.5. Complexes CDK-ciclina en càncer .....	36
4. CICLINES ATÍPIQUES .....	38
4.1. CCNI .....	40
5. RESULTATS PREVIS .....	41
<b>HIPÒTESI</b> .....	<b>43</b>
<b>OBJECTIUS</b> .....	<b>47</b>
<b>MATERIAL I MÈTODES</b> .....	<b>51</b>
1. CONSTRUCCIONS PLASMÍDIQUES .....	53
2. EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES FUSIONADES A GST .....	54
3. CO-IMMUNOPRECIPITACIÓ .....	54
4. ASSAIG DE FOSFORILACIÓ <i>IN VITRO</i> .....	55
5. ASSAIG DE FOSFORILACIÓ FLUORESCENT .....	55
6. LÍNIES CEL·LULARS I REACTIUS .....	56
7. EXTRACCIÓ I QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES DE LÍNIES CEL·LULARS .....	57
8. WESTERN BLOT .....	57
9. PRODUCCIÓ DE VIRUS, TITULACIÓ I TRANSDUCCIÓ .....	58
10. ASSAJOS DE VIABILITAT I DE PROLIFERACIÓ CEL·LULAR .....	59
11. FORMACIÓ DE COLÒNIES .....	59
12. TRANSFECCIÓ siRNA .....	60
13. EXTRACCIÓ DE RNA I PCR QUANTITATIVA EN TEMPS REAL (RT-qPCR) .....	60
14. MODEL ORTOXENÒGRAF TUMORAL .....	61
15. ANÀLISI ESTRUCTURAL .....	61
16. ANÀLISI KAPLAN-MEIER .....	62
17. ANÀLISI DEPMAP I TCGA .....	62
18. ANÀLISI ESTADÍSTIC .....	63
<b>RESULTATS</b> .....	<b>65</b>
CAPÍTOL 1. CARACTERITZACIÓ BIOQUÍMICA DEL COMPLEX CDK6-CCNI .....	67
1.1. CCNI interacciona amb CDK6 .....	67
1.2. El complex CDK6-CCNI és actiu .....	68
1.3. pRb es fosforila pel complex CDK6-CCNI <i>in vitro</i> .....	69
1.4. CCNI influeix en la fosforilació de pRb en extractes cel·lulars .....	70
1.5. El complex CDK6-CCNI es pot inhibir mitjançant palbociclib <i>in vitro</i> .....	71
1.6. Anàlisi estructural de CCNI .....	72
CAPÍTOL 2. PAPER DE LA CICLINA ATÍPICA CCNI EN DIFERENTS LÍNIES CEL·LULARS TUMORALS .....	74
2.1. La disminució dels nivells de CCNI no afecta la proliferació cel·lular .....	74



2.2.	<i>La sobreexpressió de CCNI mostra diferents efectes en la proliferació en varies línies cel·lulars</i> .....	75
2.3.	<i>L'efecte de la proliferació de CCNI es manté a mig termini</i> .....	77
2.4.	<i>La proliferació per CCNI és CDK depenent</i> .....	77
2.5.	<i>La proliferació de CCNI és depenent de CDK6</i> .....	79
2.6.	<i>La proliferació de CDK6-CCNI es pot inhibir mitjançant palbociclib</i> .....	81
2.7.	<i>L'increment de CCNI intracel·lular està associat amb un augment del creixement tumoral in vivo</i> .....	82
2.8.	<i>Expressió de proteïna de CCNI i CCND1 en el càncer</i> .....	83
2.9.	<i>Els efectes de CCNI són dependents de teixit, del context genètic i ambiental</i> .....	85
2.10.	<i>Incrementar els nivells de CCNI en cèl·lules sense pRb no afecta la proliferació</i> .....	87
2.11.	<i>La senyal de CCNI va mediada a través del complex E2F</i> .....	88
	<b>DISCUSSIÓ</b> .....	<b>91</b>
	<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>99</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>103</b>

## ABREVIACIONES

---



BrdU: Bromodesoxiuridina	GSEA: <i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
BSA: Albúmina sèrica de boví	GST: Glutació S-transferasa
CAK: Cinasa activadora de CDK	HeBS: <i>HEPES-buffered saline</i>
CCND1: Ciclina D1	HER2: <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
CCNI: Ciclina I	HR: Receptor hormonal
CDK: Cinasa dependent de ciclina	HRP: <i>Horseradish peroxidase</i>
CDKACT6: pèptid biosensor fluorescent específic de CDK6	INK4: Inhibidor de CDK4
CDKN2A: <i>Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2A</i>	IPTG: Isopropyl- $\beta$ -D-1-tiogalctopiranòsid
cDNA: DNA codificant	MOI: <i>Multiplicity Of Infection</i>
CIP/KIP: <i>Kinase Inhibitor Protein</i>	mRNA: RNA missatger
CKI: Inhibidor de CDK	MSigDB: Molecular Signatures Database
Co-IP: Co-Immunoprecipitació	MTT: Bromur de 3-(4,5-Dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli
DEPC: Pirocarbonat de dietil	MuvB: <i>Multi-vulval class B</i>
DMEM: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	NSCLC: <i>Non-Small-Cell Lung Carcinoma</i>
DMSO: Dimetilsulfòxid	NT: <i>Non-Targeting siRNA</i>
DREAM: <i>Dimerization partner, RB-like, E2F and Multi-vulval class B</i>	O/N: <i>Over night</i>
DTT: Ditiotreitòl	OMS: Organització Mundial de la Salut
EC: Extracte cel·lular	PBD: <i>Protein Data Bank</i>
EDTA: Àcid etilendiamintetraacètic	PBS: Tampó fosfat salí
EGFR: <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>	PCR: Reacció en cadena de la polimerasa
EGTA: <i>ethylene glycol-bis(<math>\beta</math>-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>	PMSE: <i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
ER: Receptor d'estrogen	PNBM: p-nitrobencilmesilat
fase G <sub>1</sub> ; G <sub>2</sub> : <i>Gap</i>	PR: Receptor de progesterona
FBS: Sèrum boví fetal	pRb: Proteïna del retinoblastoma
FDA: <i>Food and Drug Administration</i>	PVDF: <i>Polyvinylidene difluoride</i>
	rpm: Revolucions per minut

## Abreviacions

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute Medium*

RT-qPCR: PCR quantitativa en temps real

SB: tampó de carga

SCLC: *Small-Cell Lung Carcinoma*

SDS: Dodecilsulfat sódic

SEM: Error estàndard de la mitjana

siRNA: RNA de silenciament

TBS-T Buffer salí Tris suplementat amb Tween-20

TCGA: *The Cancer Genome Atlas*

TGF- $\beta$ : Factor de creixement transformant- $\beta$

TGRD: *Tomato Genomic Resources Database*

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*

VEGFR2: *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*

WT: *Wild Type*

Y2H: Doble híbrid en llevat

NOTA: s'ha preferit mantenir algunes paraules en anglès per ser fidel al seu significat

# INTRODUCCIÓ

---



## 1. EPIDIMIOLOGIA DEL CÀNCER

Des dels últims anys s'entén que els tumors no poden estudiar-se com simples masses cel·lulars, ja que el càncer és un terme genèric que designa un conjunt de malalties englobades en un sol nom que poden afectar qualsevol regió de l'organisme. Avui en dia, el càncer representa aproximadament 1 de cada 6 morts a tot el món (OMS, Organització Mundial de la Salut, 2020). Al 2020, s'estima que es van diagnosticar més de 20 milions de casos de càncer a tot el món i aproximadament 10 milions de morts per càncer. Actualment els més comuns són càncer de mama, càncer pulmonar i càncer colorectal.

### 1.1. Càncer de mama

L'any 2020 va ser el càncer més comú al món i suposa unes 40.000 morts anuals (OMS, 2020). El càncer de mama es classifica segons l'expressió o no dels receptors hormonals (HR) que inclou el receptor d'estrogen (ER), el receptor de progesterona (PR) i el receptor HER2 (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*) (Scott, Lee, & Abraham, 2017). En aquest sentit, la teràpia endocrina és considerada la principal teràpia pels càncers HR positius, tot i que una gran proporció de pacients acaba adquirint resistència a aquesta teràpia. Aquesta limitació ha comportat identificar noves dianes terapèutiques, com els inhibidors reversibles selectius de CDK4/6 palbociclib (PD0332991), ribociclib (LEE011) i amebaciclib (LY2835219), a causa de la importància que tenen aquestes CDKs (Cinasa dependent de ciclina) i els seus reguladors en el cicle cel·lular (Pandey et al., 2019). Actualment només estan aprovats per la FDA (*Food and Drug Administration*) pel tractament del càncer de mama juntament en combinació amb teràpies hormonals, però també s'està avaluant el seu efecte terapèutic (sols o en combinació) en múltiples assajos clínics per altres tipus de càncers humans (Klein, Kovatcheva, Davis, Tap, & Koff, 2018).

### 1.2. Càncer de pulmó

És la principal causa de mort relacionada amb càncer a tot el món (OMS, 2020). El càncer de pulmó és dividit en dos grups principals, el carcinoma pulmonar de cèl·lules no petites (NSCLC; *Non-small-cell lung carcinoma*) que representa aproximadament el 85% dels casos i el carcinoma pulmonar de cèl·lules petites (SCLC; *Small-cell lung carcinoma*) que representa el 15% restant i és més agressiu i dissemina més ràpid que el NSCLC (Gridelli et al., 2015). En un 20% dels NSCLC, l'oncogen KRAS està mutat, produint una activació constitutiva de la via RAS/MEK/ERK incrementant la proliferació, supervivència, angiogènesis i progressió tumoral. Aquesta mutació disminueix l'eficàcia a la quimioteràpia i radioteràpia (Liu, Liu, & Chen, 2018).



### 1.3. Càncer colorectal

L'any 2020, el càncer colorectal va representar la segona causa de mort per càncer en tot el món (OMS, 2020). La incidència de mutacions en els oncògens KRAS, NRAS o BRAF en el càncer colorectal és especialment alta, suposant una freqüència de més del 50%. Això causa una activació constitutiva de la via RAS/MEK/ERK independentment de EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), en els quals inhibidors d'aquest receptor no mostren eficàcia, limitant el tractament d'aquests pacients (Koveitypour et al., 2019). Inhibidors de MEK causen una disminució de la proliferació cel·lular *in vitro*, però sense efectes terapèutics en pacients, determinant la necessitat de trobar teràpies combinades per tractar el càncer colorectal (Goel, 2018).

## 2. CICLE CEL·LULAR

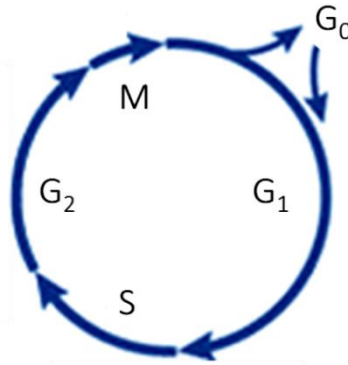
Una de les característiques indiscutibles del càncer és una proliferació descontrolada de les cèl·lules tumorals (Hanahan & Weinberg, 2011). Les cèl·lules tumorals acumulen mutacions que donen com a resultat senyals constitutives mitogèniques i una resposta defectiva a senyals anti-mitogèniques contribuint en una continua proliferació o una entrada al cicle cel·lular no programada (Malumbres and Barbacid 2009).

El cicle cel·lular és un procés altament conservat que permet el creixement i divisió cel·lular. Es caracteritza per una sèrie d'esdeveniments ordenats a través dels quals les cèl·lules dupliquen el seu contingut i formen dues cèl·lules filles idèntiques a la cèl·lula mare. Els detalls del cicle cel·lular varien entre espècies, però l'esquema de les seves fases és universal, anomenant aquestes com  $G_1$  (*Gap*), S,  $G_2$  i M (figura 1).

De manera força resumida es podria dir que durant la fase  $G_1$  la cèl·lula creix i comença la transcripció de gens i síntesis de proteïnes involucrades en la replicació del DNA. La fase S (síntesis de DNA) implica la duplicació del genoma i, seguidament a la fase  $G_2$  es comprova si el DNA s'ha replicat correctament, si la cèl·lula té la mida adequada i s'inicia la preparació per la divisió cel·lular. Finalment a la fase M (mitosis) es reparteix equitativament el material genètic conclouent amb la formació de dos nuclis (cariocinesis) i la divisió del citoplasma (citocinesis), donant lloc finalment a dues cèl·lules filles (Schafer, 1998).

Les noves cèl·lules formades poden seguir la divisió cel·lular i entrar de nou en el cicle o parar de proliferar. Aquesta decisió està determinada, no només per la pròpia informació interna de la cèl·lula, sinó també per senyals externes mitogèniques. Tot i que, aquestes últimes afecten la progressió del cicle cel·lular fins un determinat moment de  $G_1$ , anomenat punt de restricció o punt R, després del qual la progressió a

través del cycle està compromesa independentment de les senyals ambientals. L'abandonament del cycle, temporal o permanent implica l'absència de senyals pro-mitogèniques i/o la presència de senyals anti-mitogèniques, produint que la cèl·lula entri en un estat quiescent conegut com a  $G_0$  (figura 1) (Murray, 2004).



**Figura 1. Cycle cel·lular de mamífers.** Representació de les fases del cycle cel·lular ( $G_1$ , S,  $G_2$ , M) i estat quiescent  $G_0$ .

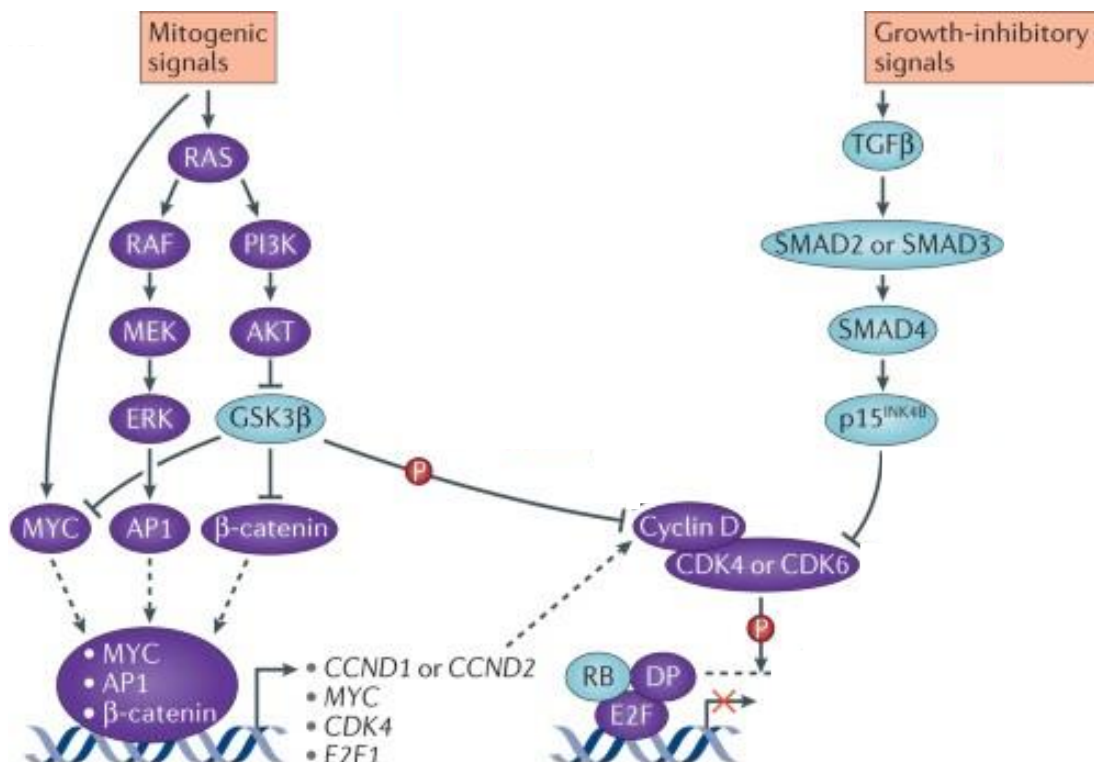
Assegurar una correcta divisió cel·lular és primordial, per això el cycle cel·lular es compon d'un conjunt de punts de control (*checkpoints*) que verifiquen si cada fase del cycle s'ha completat correctament abans de passar a la següent fase, assegurant la fidelitat de la divisió cel·lular. L'activació d'aquests punts de control implica la parada del cycle que no es reprendrà fins que els errors detectats no siguin reparats (Hartwell and Weinert, 1989).

## 2.1. Principals vies de senyalització del cycle cel·lular

Per a que una cèl·lula es divideixi és necessari que rebi senyals del seu entorn, però les vies que processen aquestes senyals freqüentment estan alterades en el càncer (Bertoli, Skotheim, & De Bruin, 2013).

Les principals vies de senyalització involucrades en la proliferació que condueixen a les cèl·lules a l'activació dels primers esdeveniments de  $G_1$  són els eixos Ras-Raf-MAPK i PI3K-Akt-GSK3 $\beta$  (figura 2). L'objectiu és incrementar la transcripció dels components inicials de la maquinaria cel·lular, entre ells els més rellevants la ciclina D (CCND) i MYC (Choi & Anders, 2014).

També hi ha vies de senyalització anti-proliferatives, que eviten que les cèl·lules entrin al cycle cel·lular (figura 2). Un exemple important és la via de senyalització Smad controlada pel factor de creixement transformant- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Koveitypour et al., 2019).



**Figura 2. Principals vies de senyalització del cicle cel·lular.** Les vies induïdes per senyals mitogèniques o senyals pro-inflamatòries activen els factors de transcripció MYC i β-catenina que indueixen gens involucrats en la progressió del cicle cel·lular, entre ells el més important CCND. Per contra les vies induïdes per senyals inhibidores del creixement aturen la progressió del cicle cel·lular. Modificat de Otto et al., 2017.

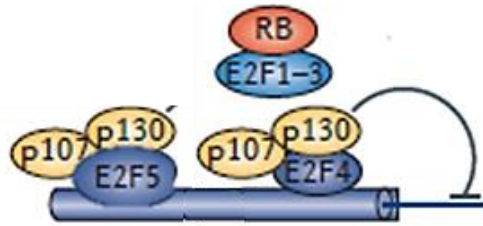
## 2.2. Regulació transcripcional del cicle cel·lular

El cicle cel·lular està controlat per una xarxa de reguladors que asseguren que els esdeveniments de cada fase es duguin a terme en un ordre adequat. La importància d'aquests reguladors queda reflectida a causa de l'elevada freqüència de mutacions que es produeixen en aquestes proteïnes en el càncer (Bertoli et al., 2013).

Un dels factors de transcripció més importants que actua pocs minuts després de les senyals mitogèniques és MYC, una família de proto-oncogens formada per l-myc, n-myc i c-myc. MYC té un paper central en el creixement cel·lular, la progressió del cicle cel·lular i apoptosi (Pelengaris, Rudolph, & Littlewood, 2000). Alguns dels gens diana més ben establerts amb una participació directa en el cicle cel·lular són CCND, p21 i cdc25A. Precisament c-myc és el més expressat dels tres i un dels oncogens més freqüentment activat en càncer (Albiñ, Johnsen, & Arsenian Henriksson, 2010).

Una altra família de factors de transcripció clau en la regulació del cicle cel·lular és la família E2F. Els factors de transcripció E2F es classifiquen en activadors transcripcionals (E2F1, E2F2 i E2F3A) o repressors (E2F3B i E2F4-E2F8). Tot i que recentment sembla

que aquest escenari està canviant i alguns components activadors poden ser repressors, i viceversa (Bertoli et al., 2013). L'activitat dels factors E2F està principalment regulada mitjançant la interacció amb les proteïnes *pocket* (pRb, p107 i p130) (figura 3).

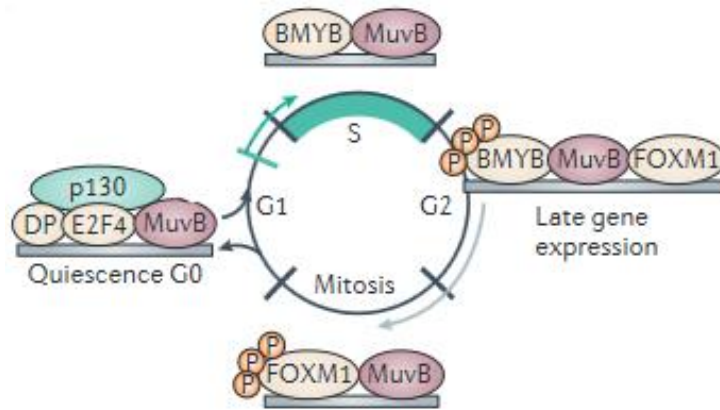


**Figura 3. Interacció entre les proteïnes E2F i les proteïnes *pocket*.** En cèl·lules de mamífer els repressors transcripcionals pRb, p107 i p130 (proteïnes *pocket*) s'uneixen als factors de transcripció E2F per reprimir l'expressió durant  $G_0$  i l'inici de  $G_1$ . pRb evita que les proteïnes activadores E2F1-3 activin la transcripció i p107 i p130 actuen com corepressors de les proteïnes E2F4-5. RB (proteïna de retinoblastoma) Adaptat de Bertoli et al. 2013.

Durant  $G_0$  i inici de  $G_1$ , la proteïna del retinoblastoma (pRb) es troba unida principalment a les proteïnes E2F1-E2F3. Aquestes interaccions seran interrompudes mitjançant la fosforilació de pRb per part dels complexos de CDKs (*Cyclin-dependent kinases*) i ciclins resultant en l'alliberament dels factors E2F permetent l'activació transcripcional i la transició de la fase  $G_1$  a la fase S (Johnson et al., 2016).

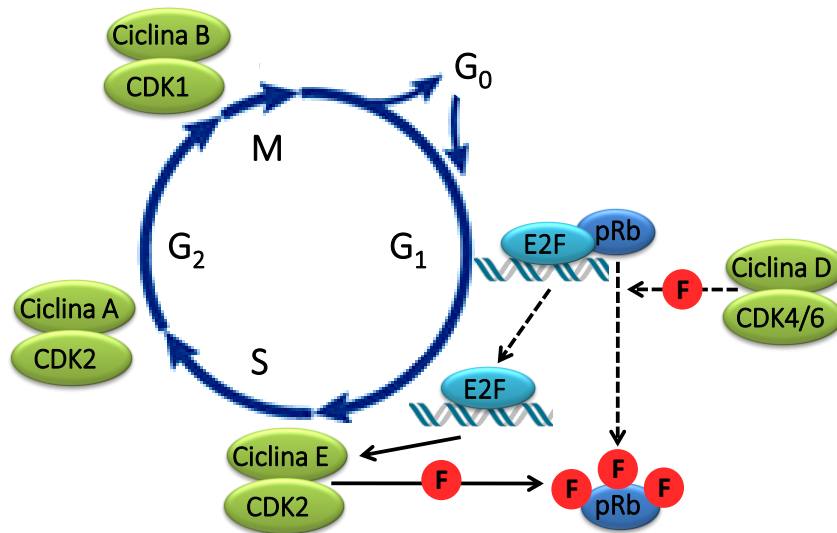
A més a més, a part de pRb, diferents estudis han revelat que les proteïnes *pocket* p130 i p107, juntament amb BMYB i FOXM1 també tenen una participació en la regulació de l'expressió dels gens del cicle cel·lular (figura 4). p130 o p107 formen una multisubunitat anomenada complex DREAM (*Dimerization partner, RB-like, E2F And Multi-vulval class B*) que s'encarrega de reprimir l'expressió de la majoria de gens del cicle cel·lular durant la fase quiescent. La dissociació de les proteïnes *pocket* del core MuvB (*multi-vulval class B*) i els factors E2F4-E2F5 (components del complex DREAM) permet l'inici del cicle cel·lular.

Això facilita per una banda, que s'activi la transcripció dels gens de  $G_1$ -S controlat per E2F i per l'altra, que MuvB recluti BMYB durant la fase S i FOXM1 durant la fase  $G_2$  per promoure l'expressió dels gens que governen les fases  $G_2$ -M (Kent & Leone, 2019).



**Figura 4. Paper central del *core* MuvB en la unió i direcció dels principals factors de transcripció que promouen el cicle cel·lular.** MuvB s'uneix a p130-E2F4-DP per formar el complex DREAM a la fase  $G_0$  i reprimir l'expressió dels gens del cicle cel·lular. MuvB recluta BMYB durant la fase S i seguidament s'uneixen a FOXM1 per promoure l'expressió dels gens de les fases  $G_2$ -M. Modificat de Sadasivam and DeCaprio 2013.

Si ens situem en un esquema clàssic del cicle cel·lular de mamífers (figura 5), durant la fase  $G_1$ , senyals pro-mitogèniques inicien el cicle, induint l'expressió de les ciclines tipus D (D1, D2 i D3). Un cop induïdes, interactuen amb CDK4 i/o CDK6 activant aquestes CDKs. El complex fosforila proteïnes de la família *pocket*, entre elles la més destacada, pRb. Les proteïnes *pocket* contenen múltiples llocs de fosforilació, dels quals només alguns són reconeguts per cada complex CDK-ciclina. La fosforilació de pRb permet la seva desunió dels factors de transcripció E2F i l'inici de la síntesi de proteïnes necessàries per les següents fases del cicle cel·lular, entre elles ciclines de tipus E (E1 i E2) que formen complex amb CDK2. Aquesta parella fosforila un rang més ampli de proteïnes del cicle cel·lular permetent l'entrada a la fase S. Durant aquesta fase es degrada ciclina E i s'indueixen ciclines de tipus A, que s'uniran amb CDK2 per poder prosseguir amb el cicle cap a  $G_2$  on es sintetitza ciclina B que juntament amb CDK1 comporta iniciar la fase M. L'activació del complex CDK1-ciclina B1 permet progressar fins al final del cicle cel·lular (Malumbres and Barbacid, 2001).



**Figura 5. Principals reguladors del cicle cel·lular.** Representació dels diferents fases del cicle cel·lular de mamífers amb els diferents complexos CDK-ciclina principals per a cada fase. En G<sub>1</sub> es representa la proteïna pRb i els factors de transcripció de la família E2F units a l'DNA. La fosforilació (F) de pRb permet la transcripció de gens necessaris pel cicle cel·lular per part de E2F.

### 3. CDKs, CICLINES I ALTRES REGULADORS

#### 3.1. CDKs

Els principals reguladors del cicle cel·lular són les cinases dependents de ciclins (CDK), les quals poden fosforilar residus serina/treonina de substrats específics. L'activitat catalítica de les CDKs depèn de la seva unió a subunitats activadores anomenades ciclins, amb les que formen complexos heterodimèrics CDK-ciclina (Malumbres and Barbacid, 2005). Al llarg del cicle cel·lular de mamífers es van formant diferents complexos constituïts per varies CDKs i diferents ciclins (Morgan, 1995).

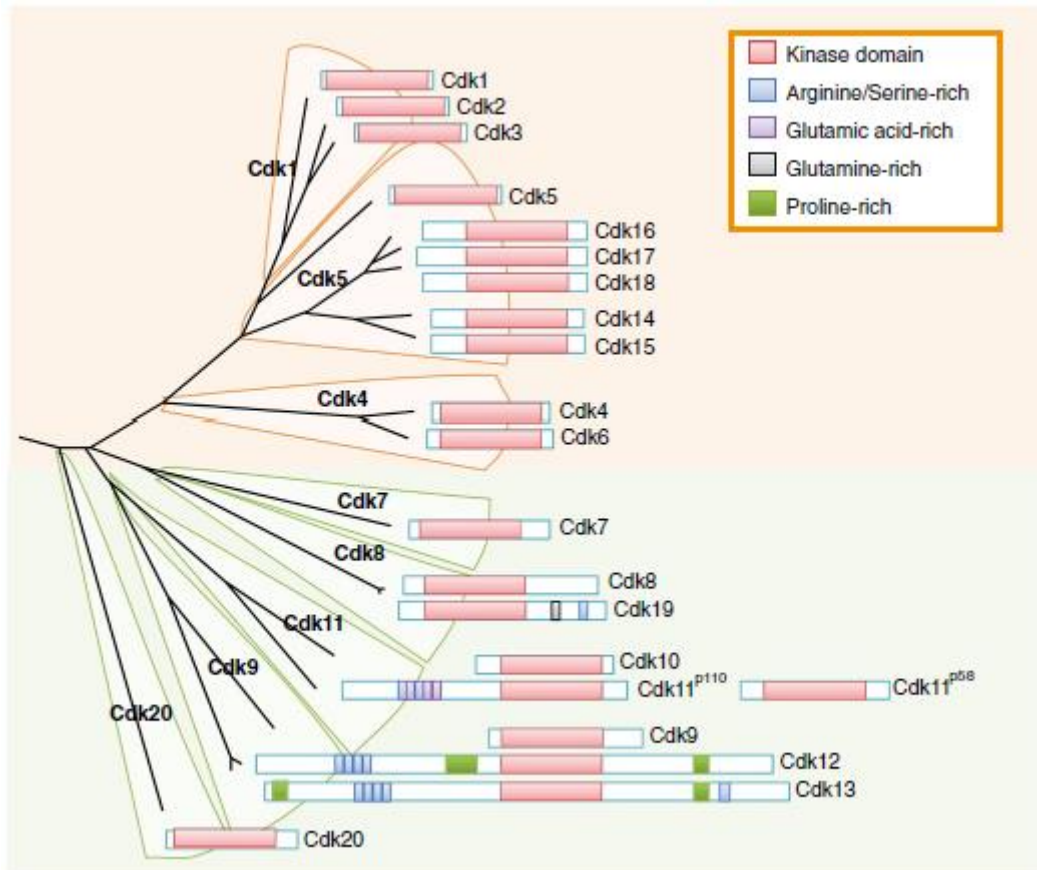
La base molecular de la divisió cel·lular es va estudiar per primer cop en llevats. En *Saccharomyces cerevisiae* es va identificar la proteïna Cdc28 (Nurse and Bissett, 1981) i a *Schizosaccharomyces pombe* (L. H. Hartwell, 1971) va ser anomenada Cdc2. En estudis posteriors es va determinar que Cdc28 i Cdc2 són homòlegs de CDK1 de mamífers (Santamaría et al., 2007).

Anàlisis posteriors del genoma humà han identificat un total de 26 CDKs diferents (Malumbres et al., 2009). No sorprèn que el nombre d'aquestes proteïnes hagi incrementat amb l'evolució, fet que els ha atorgat un major grau de divergència i d'especialització. Cada una d'aquestes CDKs està caracteritzada per un nucli catalític que conté una concavitat on encaixa l'ATP, un bucle T (*T-loop*), que impedeix la unió del substrat al lloc catalític de la CDK en absència de ciclina i un domini d'unió a ciclina

## Introducció

anomenat *PSTAIRE-like* (per la similitud amb la seqüència canònica d'aminoàcids present a CDK1) (Lim and Kaldis, 2013).

Les CDKs es classifiquen com relacionades amb cicle cel·lular (subfamílies CDK1 i CDK4), amb funcions transcripcionals (CDK7-13 i CDK19-20) (Malumbres, 2014) o amb altres funcions com la subfamília de CDK5 (CDK5 i CDK14-18) (figura 6) (Quandt et al., 2020a).



**Figura 6. Arbre filogenètic de les subfamílies de les CDKs de mamífer.** Les diferents subfamílies de cicle cel·lular (taronja) o transcripcionals (verd) estan remarcades en negreta. Es troba representat el domini estructural de cada CDK on es marca el domini cinasa conservat (vermell) i dominis addicionals (consultar llegenda). L'arbre filogenètic està basat en la comparació dels dominis cinasa humans. Imatge de Malumbres 2014.

## 3.2. Ciclines

Les ciclines són la subunitat reguladora positiva necessària per l'activació de les CDKs. Estan estructuralment definides per una caixa ciclina o *cyclin box*, un domini situat a l'extrem N-terminal format per uns 100 aminoàcids organitzats en cinc hèlix- $\alpha$ . Aquest domini permet que la ciclina s'uneixi i activi la CDK. Altres ciclines però, tenen una segona caixa ciclina situada a l'extrem C-terminal que està involucrada en el propi

plegament de la proteïna. Estudis més recents suggereixen que aquesta caixa ciclina C-terminal estaria involucrada també en funcions independents de CDK.

Estudis en ous d'eriçons de mar van identificar les ciclins com un conjunt de proteïnes que es sintetitzaven i degradaven en diferents moments del cicle cel·lular, fet que els va atorgar el seu nom. Aquest comportament cíclic és el que permet regular l'activitat de les CDKs de manera temporal durant el cicle cel·lular per a que actuïn en el moment adequat. Però no totes les CDK són activades per ciclins, per exemple CDK5 pot ser activada per proteïnes sense una naturalesa de ciclina (Nebreda, 2006). Un altre cas són les ciclins virals, proteïnes que comparteixen una petita seqüència de la caixa ciclina amb les ciclins cel·lulars. Per exemple, la ciclina viral K, present en el sarcoma de Kaposi conté un 30% de similitud amb ciclina D2 i pot formar complexos actius amb CDK4 i CDK6 (Card, 2000).

Al igual que la classificació de les CDKs, les ciclins també s'han dividit entre les que participen en el cicle cel·lular i les transcripcionals, però l'enorme solapament de les funcions i la diversitat de les ciclins han fet que la nomenclatura hagi estat confosa fins fa poc (Quandt et al., 2020a). El nostre grup ha fet una proposta de classificar les ciclins com canòniques, atípiques i transcripcionals (figura 11).

En aquests moments es coneixen moltes parelles CDK-ciclina que s'han anat descobrint al llarg dels anys. Malgrat tot, no es coneix la CDK de totes les ciclins i algunes se sap que actuen de manera independent, per això sempre es tracten com unes proteïnes a part, com per exemple CCNF. La figura 7 resumeix l'estat actual de les parelles CDK-ciclina.

Tal com es pot observar a la figura 7, no es coneixen totes les parelles possibles i és per això que calen recerques sistemàtiques que permetin descobrir nous aparellaments CDK-ciclina. Aquest ha estat precisament un dels objectius del grup on he realitzat la tesi doctoral (Quandt et al. manuscrit en revisió).



		Cicle cel·lular					Atípiques					Transcripcionals											
		CDK1			CDK4		CDK5					CDK8			CDK11		CDK9		CDK20				
		CDK1	CDK2	CDK3	CDK4	CDK6	CDK5	CDK14	CDK15	CDK16	CDK17	CDK18	CDK7	CDK8	CDK19	CDK10	CDK11A	CDK11B	CDK9	CDK12	CDK13	CDK20	
Canòniques	CCNA1	■	■																				
	CCNA2	■	■																				
	CCNB1	■																					
	CCNB2	■																					
	CCNB3	■																					
	CCND1				■	■																	
	CCND2				■	■	■																
	CCND3				■	■	■																
	CCNE1		■	■																			
	CCNE2		■	■																			
Atípiques	CABLES1						■	■															
	CABLES2						■	■															
	CCNG1						■	■															
	CCNG2																						
	CCNI						■	■		■													
	CCNI2						■	■															
	CCNJ																						
	CCNJL																						
	CCNO																						
	CCNP																						
	CCNY							■	■		■												
	CCNYL1																						
	CCNYL2																						
	CNPPD1																						
CNTD1																							
Transcripcionals	CCNC			■									■	■									
	CCNH											■	■										
	CCNK																		■	■	■	■	
	CCNL1																						
	CCNL2																						
	CCNQ														■								
	CCNT1																						
CCNT2																							

Figura 7. Interaccions CDK-ciclina. Les ciclines s'han agrupat entre canòniques, transcripcionals i atípiques, mentre que les CDKs s'han agrupat com cicle cel·lular, transcripcionals i atípiques com descriu Malumbres i atípiques com descriu Malumbres 2014. La taula mostra les interaccions descrites entre CDK-ciclina. Adaptada de Quandt et al. 2020.

### 3.3. Complexes CDK-ciclina

De les parelles conegudes, només un subconjunt de complexes CDK-ciclina tenen una participació directa en la progressió del cicle cel·lular, per això són anomenats complexos de cicle cel·lular o canònics. En aquesta classificació trobem CDK1, CDK2, CDK4 i CDK6 més deu ciclines que pertanyen als tipus A, B, D i E (Hydbring, Malumbres, and Sicinski 2016).

Fins al moment, la única ciclina que s'ha vist capaç d'interaccionar amb CDK4 i CDK6 són les ciclines tipus D. Amb l'existència d'aquestes dues CDKs actuant a la mateixa fase del cicle cel·lular i la seva unió amb les tres isoformes tipus D sembla existir una certa redundància entre aquestes proteïnes. Segurament diferents combinacions entre aquestes CDKs i ciclines proporcionen una flexibilitat addicional en diferents tipus cel·lulars o en resposta a diferents senyals mitogèniques. A més, la gran varietat de tipus cel·lulars en mamífers adults requereix variacions en el cicle cel·lular i això permet

una regulació del cicle de manera teixit específic. Diverses dades clíniques suggereixen que certes malalties humanes són causades per alteracions en la funció de les cinases canòniques incloent patologies específiques de teixit (Malumbres, 2011).

El rol dels complexos CDK-ciclina canònics en el cicle cel·lular està molt ben establert, però aquest no és l'únic paper que tenen aquests complexos, ja que cada vegada hi ha més evidències de la seva participació en la transcripció genètica, reparació de dany al DNA, mort cel·lular, diferenciació, angiogènesis i regulació del metabolisme (Hydbring, Malumbres, and Sicinski 2016). I tal com passa amb aquests complexos també hi ha evidències de CDKs no canòniques amb funcions en la regulació del cicle cel·lular. Per tant, l'esquema característic del cicle cel·lular no és prou representatiu, ja que no implica altres possibles interaccions menys freqüents entre CDK-ciclina i/o rols compensatoris entre aquestes (Malumbres, 2014).

Tot i aquesta variabilitat de CDKs, CDK1 és la única CDK essencial per dur a terme el cicle cel·lular, tal com es va veure en estudis en el que es van deletar diferents CDKs en ratolins. Es va observar que CDK1 és una cinasa essencial en el cicle cel·lular fins etapes embrionàries intermèdies (E12.5). En canvi, CDK2, CDK4 i CDK6 són necessàries per la proliferació de certs tipus cel·lulars, indicant que aquestes CDKs són essencials en situacions determinades com podria ser pel desenvolupament de teixits concrets o determinades situacions patològiques, com el càncer (Malumbres and Barbacid, 2009a).

### 3.4. Regulació de l'activitat dels complexos CDK-ciclina

Les CDK no estan regulades exclusivament per la unió amb les ciclines, sinó que també existeixen altres mecanismes, com fosforilacions activadores per la CAK (Cinasa activadora de CDK), fosforilacions inhibidores i unió a CKI (Inhibidor de CDK) (Malumbres and Barbacid, 2005).

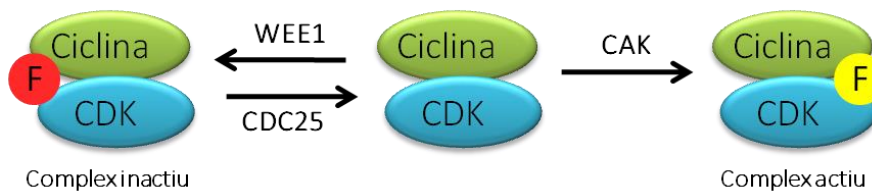
#### 3.4.1. Regulació de l'activitat per fosforilacions/desfosforilacions

En humans, CAK és un complex proteic format per tres proteïnes, CDK7, ciclina H i Mat1. Després de la unió a ciclina, algunes CDKs necessiten també una fosforilació addicional per part de la CAK per ser completament actives (figura 8). A part d'activar CDKs, la CAK també té funcions en la regulació de la transcripció (Lolli and Johnson, 2005).

La fosforilació inhibidora per regular negativament l'activitat de les CDKs més coneguda és la realitzada per la cinasa WEE1 (figura 8) a la tirosina 15 de la CDK. Aquesta fosforilació no indueix grans canvis conformacionals en l'estructura, però sí que redueix

## Introducció

l'afinitat de la CDK pel seu substrat (Nurse, 2004). Aquesta fosforilació senyalitza una gran diversitat de problemes en la cèl·lula, com ara problemes morfogènics (Qiu, Wang, Ying, and Feng, 2015), de dany al DNA (Elbæk, Petrosius, and Sørensen, 2020), osmòtics (Clotet et al., 2006), etc. i permet allargar la fase  $G_2$  fins que aquests problemes són corregits. La reactivació de la CDK es produeix gràcies a l'activitat de la família de fosfatases CDC25, que desfosforilen les CDKs (figura 8) i permeten l'entrada a mitosi (Malumbres and Barbacid, 2009b). A més, aquesta família també regula altres transicions entre les diferents etapes del cicle cel·lular. Aquest mecanisme de regulació és essencial en la cèl·lula com ho demostra el fet que es troba conservat evolutivament des d'eucariotes unicel·lulars fins els mamífers.



**Figura 8. Mecanisme d'activació del complex CDK-ciclina.** Un cop format el complex CDK-ciclina, aquest ha de ser activat mitjançant la fosforilació al *T-loop* per part de la CAK. El complex es regula negativament per WEE1, acció que és revertida per la fosfatasa CDC25.

### 3.4.2. Regulació per CKIs

A part de les fosforilacions/desfosforilacions, les CDK també poden ser regulades per subunitats inhibidores. Aquesta funció la duen a terme les proteïnes CKI que impliquen la parada del cicle cel·lular produïda en resposta a senyals intrínseques o extrínseques del cicle, com poden ser les senyals relacionades amb senescència, activació d'un punt de control o resposta a senyals anti-mitogèniques. En cèl·lules de mamífers s'han descrit dues famílies de CKIs, la família CIP/KIP (*Kinase inhibitor protein*) i la família INK4 (Inhibidor de CDK4) (Russo et al., 1998). La nomenclatura d'aquests inhibidors presenta un batibull de possibilitats degut als diferents moments històrics que s'anaven descobrint (taula 1).

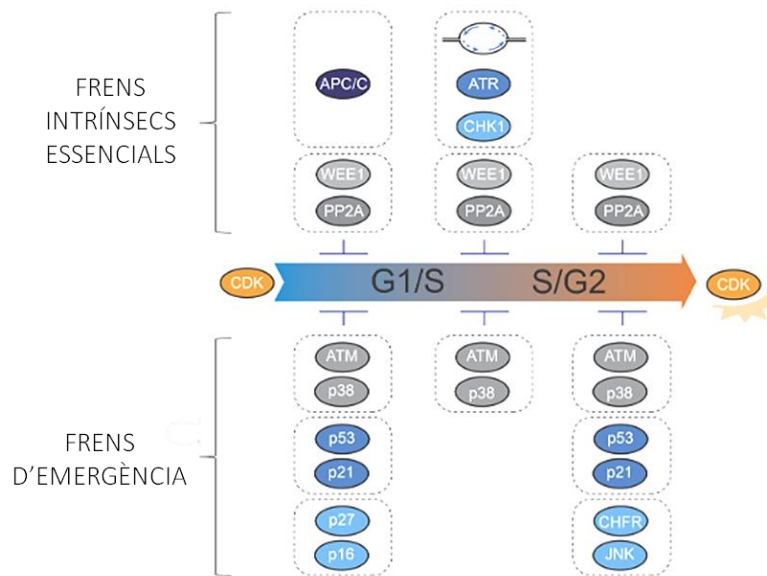
La família CIP/KIP inclou tres proteïnes estructuralment relacionades entre elles ( $p21^{Cip1}$ ,  $p27^{Kip1}$  i  $p57^{Kip2}$ ). Aquestes proteïnes presenten una especificitat bastant ampla, ja que poden inhibir l'activitat cinasa de la majoria de complexos CDK-ciclina canònics. Contràriament al seu paper, aquesta família també s'ha descrit com a factors d'acoblament que promouen la formació de complexos CDK4/6-ciclina D durant la fase  $G_1$  del cicle cel·lular i depenent del seu estat de fosforilació, el complex ternari CDK-ciclina-CIP/KIP pot ser catalíticament actiu. Es creu que aquest rol contradictori d'aquests CKI en la progressió del cicle és depenent de tipus cel·lular (Hallett et al., 2017).

Família INK4	
Proteïna	Gen
p16 INK4a	CDKN2A
p15 INK4b	CDKN2B
p18 INK4c	CDKN2C o CDKN6
p19 INK4d	CDKN2D
p14 ARF	CDKN2A
Família CIP/KIP	
Proteïna	Gen
p21 CIP1	CDKN1A, CIP1 o WAF1
p27 KIP1	CDKN1B o KIP1
p57 KIP2	CDKN1C o KIP2

Taula 1. Nomenclatura dels membres de la família INK4 i els CIP/KIP.

La família INK4, en canvi bloqueja el cicle cel·lular de manera específica per unió a CDK4 i CDK6 quan estan en forma de monòmers. Tot i que els llocs d'unió per INK4 i ciclina D en les CDK4/6 no se superposen, la unió de INK4 altera la disposició del domini cinasa debilitant la interacció amb la ciclina. Aquesta família inclou p15<sup>INK4b</sup>, p16<sup>INK4a</sup>, p18<sup>INK4c</sup> i p19<sup>INK4d</sup> (Hallett et al., 2017). A més, el gen CDKN2A (*Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2A*) (que codifica per p16<sup>INK4a</sup> també codifica per p14<sup>ARF</sup>, una proteïna que també està involucrada en la regulació del cicle cel·lular, però no inhibint CDK4/CDK6, sinó que actua a través de p53 (Sherr, 2006).

Tota aquesta complexitat de controls de les CDKs permeten una gran plasticitat en la regulació del cicle cel·lular. Efectivament, la presència de frens intrínsecs i de frens d'emergència (Lemmens and Lindqvist, 2019) fa que les cèl·lules es puguin adaptar a múltiples situacions de perill tan extern com intern (figura 9).

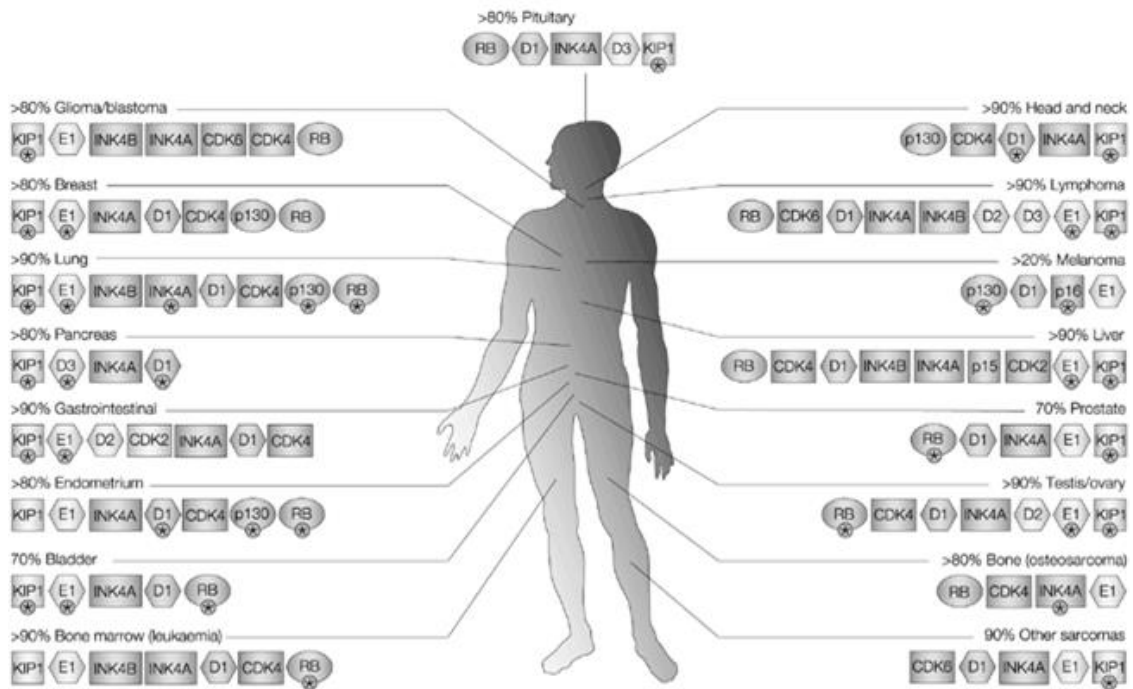


**Figura 9. Dos tipus de frens controlen la progressió del cicle cel·lular.** Els frens intrínsecs són essencials per a la vida i garanteixen la dependència de la fase del cicle cel·lular. Els frens d'emergència, en canvi, retarden o paren la progressió del cicle cel·lular a partir d'indicacions i tensions externes. El complex APC/C, ATR/CHK1 i WEE1/PP2A representen frens intrínsecs necessàries per frenar l'activació de CDK durant el cicle cel·lular (panell superior). Per contra, factors de senyalització com ATM, p38, p27, p16, p53, p21, CHFR i JNK no són essencials per la proliferació cel·lular *per se*, però inhibeixen eficaçment l'activació de CDK en cas d'estrès (panell inferior). Adaptat de Lemmens and Lindqvist 2019.

### 3.5. Complexes CDK-ciclina en càncer

La desregulació de la proliferació de les cèl·lules tumorals es deguda directa o indirectament per una desregulació de l'activitat dels complexos CDK-ciclina. La majoria de tumors mostren mutacions o alteracions epigenètiques en les molècules reguladores positives de les CDKs com les ciclines, negatives com els inhibidors INK4, CIP/KIP, en els substrats o també en les vies mitogèniques (Malumbres et al., 2008).

Degut al paper directe que tenen les CDKs i ciclines canòniques en la progressió del cicle cel·lular, estan ben documentades diverses de les mutacions que es produeixen en aquestes proteïnes en els diferents càncers humans. En aquesta direcció, molts estudis centrats en la via ciclina-CDK-pRb en tumors humans han demostrat que la regulació de la fase G<sub>1</sub>-S del cicle cel·lular està alterada en quasi tots els tumors humans (Malumbres and Barbacid, 2001). Les principals alteracions es troben resumides a la figura 10.



**Figura 10. Principals mutacions dels reguladors de G<sub>1</sub>/S en el càncer humà.** Només s'han tingut en compte les alteracions que es troben en més del 10% de tumors primaris. Els números representen el percentatge de tumors amb alteracions en els reguladors del cicle cel·lular citats. L'asterisc (\*) representa alteracions rellevants pel pronòstic del tumor (Malumbres and Barbacid 2001).

Més del 80% dels tumors mostren alterada l'activitat de CDK2, CDK4 i/o CDK6 (Malumbres and Barbacid 2009). La desregulació de l'activitat de CDK4 i CDK6 està implicada en una ampla varietat de tumors, ja que els seus gens estan amplificats o sobreexpressats en diversos càncers com sarcoma, glioma, càncer de mama, limfoma i melanoma (Malumbres and Barbacid 2009).

El gen de ciclina D1 representa el segon locus més freqüentment amplificat en tots els tipus de càncers humans. Per exemple, està sobreexpressada en diversos tipus de neoplàsies com carcinomes colorectals i gliomes (Hydbring et al., 2016).

Ciclina E es troba sobreexpressada en un 50-60% d'adenomes gàstrics i també està correlacionada amb càncer d'ovari, en el qual també està sobreexpressada (Stamatakis et al., 2010).

Certs càncers també mostren afectacions en els CKIs a causa de mutacions. p16<sup>INK4b</sup> està comunament mutada en diversos tumors que debiliten la seva unió a CDK4/6. Però realment s'ha vist que aquestes mutacions no actuen mitjançant el mateix mecanisme entre CDK4 i CDK6. Per exemple, la mutació al residu metionina 53 de p16<sup>INK4b</sup> permet una unió igual d'efectiva a CDK6 que la p16<sup>INK4b</sup> WT (*wild-type*), però en canvi aquesta p16<sup>INK4b</sup> mutada té una afinitat molt més reduïda cap a CDK4. Això suggereix que aquesta mutació només aportarà un benefici proliferatiu al tumor quan en aquest la CDK4 sigui la conductora principal en G<sub>1</sub> del cicle cel·lular (Hallett et al., 2017).

L'existència de les diferents CDKs ha fet plantejar la possibilitat de si les cèl·lules tumorals necessiten CDKs específiques per proliferar. Tot i que certs estudis han demostrat que per exemple CDK4 no és necessària per desenvolupar la glàndula mamària, s'ha vist que si que es necessita per desenvolupar tumors en aquesta glàndula sota certs contextos cel·lulars com per oncògens com MYC (Malumbres and Barbacid, 2009b). Per tant, aquests estudis juntament amb el paper rellevant dels complexos CDK-ciclina en la divisió i la seva desregulació en el càncer demostren la importància de determinar i caracteritzar aquestes proteïnes i el seu context tumoral per conèixer el seu rol i dissenyar correctament l'estratègia terapèutica per inhibir a cada tumor la cinasa adequada (Yu, Geng, and Sicinski, 2001).

Degut a que la majoria d'alteracions genètiques es concentren en l'inici de la fase  $G_1$  o la transició de  $G_1$  a S, les parelles CDK-ciclina involucrades en aquestes etapes del cicle cel·lular es consideren les dianes prometedores en la teràpia del càncer. Per això, els fàrmacs inhibidors de CDKs són candidats potencials gràcies al seu paper restaurador en el control del cicle cel·lular. A més, diferents tipus tumorals, depenen de l'espectre de mutacions que tinguin, poden mostrar sensibilitats diferents a aquests inhibidors. És cert que s'ha de tenir en compte que tot i que la inhibició de certes cinases canòniques *in vitro* ha induït la parada del cicle cel·lular, aquests resultats no s'han reproduït *in vivo*, suggerint que existeix la presència d'altres membres de la família amb papers compensatoris (Malumbres, 2011). Tot i així, determinar l'existència de nous complexos CDK-ciclina permetria establir noves dianes per desenvolupar inhibidors selectius, i en definitiva, nous fàrmacs en el tractament del càncer (Malumbres and Barbacid, 2005).

## 4. CICLINES ATÍPIQUES

Tal com s'ha comentat anteriorment, l'anàlisi informàtic del projecte genoma humà va identificar una desena de nous gens portadors del domini *cyclin box*. Aquest fet va incrementar la complexitat de la família de les ciclins dificultant la integració i classificació dels nous membres en aquesta família (Malumbres, 2014).

Fins fa poc, aquestes noves ciclins eren conegudes com a "noves", "orfes" o "atípiques", tres noms que en el seu moment mostraven o bé la seva recent descoberta, o el desconeixement de la possible CDK amb la que formaven complex o bé certes especificitats estructurals, respectivament. Però des de la seva identificació fins avui en dia aquestes ciclins ja no les podem considerar "noves" en el sentit estricte de la paraula, i per alguns casos s'han pogut identificar interaccions entre algunes d'aquestes ciclins i CDKs, com per exemple CDK5-CCNI o CDK16-CCNY (Brinkkoetter et al., 2009; Mikolcevic et al., 2012) el que implica que per algunes d'elles considerades en un inici "orfes" avui en dia coneixem la seva parella CDK.

La dificultat per classificar i agrupar aquestes "noves" ciclines va fer proposar un criteri per resoldre aquest problema. Així en aquesta tesi es farà referència a aquestes ciclines com a ciclines atípiques seguint el criteri establert al treball del nostre grup (Quandt et al., 2020a) on es realitza una anàlisi de la família al complert i es proposen tres aspectes principals per definir i classificar la família de les ciclines.

Primerament, en la interacció de la ciclina amb la CDK s'ha vist que hi ha un parell d'aminoàcids essencials per aquesta funció, el parell lisina-glutamina. Totes les ciclines tenen aquests residus, però les ciclines canòniques i transcripcionals a més tenen un doblet glutàmic, que no està present en les ciclines atípiques (Quandt et al., 2020a).

Seguidament, tal com s'ha explicat, les ciclines contenen una *cyclin box*. En concret les ciclines canòniques contenen dues *cyclin box*, una N-terminal que permet la unió amb la CDK i una C-terminal involucrada en el plegament proteic. Tal i com es pot veure a la figura 11, la majoria de les ciclines atípiques només presenten la caixa ciclina N-terminal (Quandt et al., 2020a).

Finalment, si s'analitzen les interaccions entre CDKs i ciclines, es pot comprovar que les ciclines canòniques interactuen amb CDKs de cicle cel·lular a causa del paper que juguen en aquest procés, les ciclines transcripcionals interactuen principalment amb les CDKs de transcripció, també relacionat amb el seu rol i en canvi, les ciclines atípiques interaccionen principalment amb CDKs atípiques. Tot i així, aquesta última característica està limitada per l'absència d'estudis que investiguin les interaccions entre CDKs i ciclines, fent possible que amb el temps sorgeixin més complexos encara no identificats (Quandt et al. 2020a; Quandt et al. manuscript en revisió).

En resum, les ciclines atípiques són una subfamília de les ciclines amb peculiaritats estructurals i funcionals, de les quals es tenen poques dades, el que les fa un grup interessant per al seu estudi.



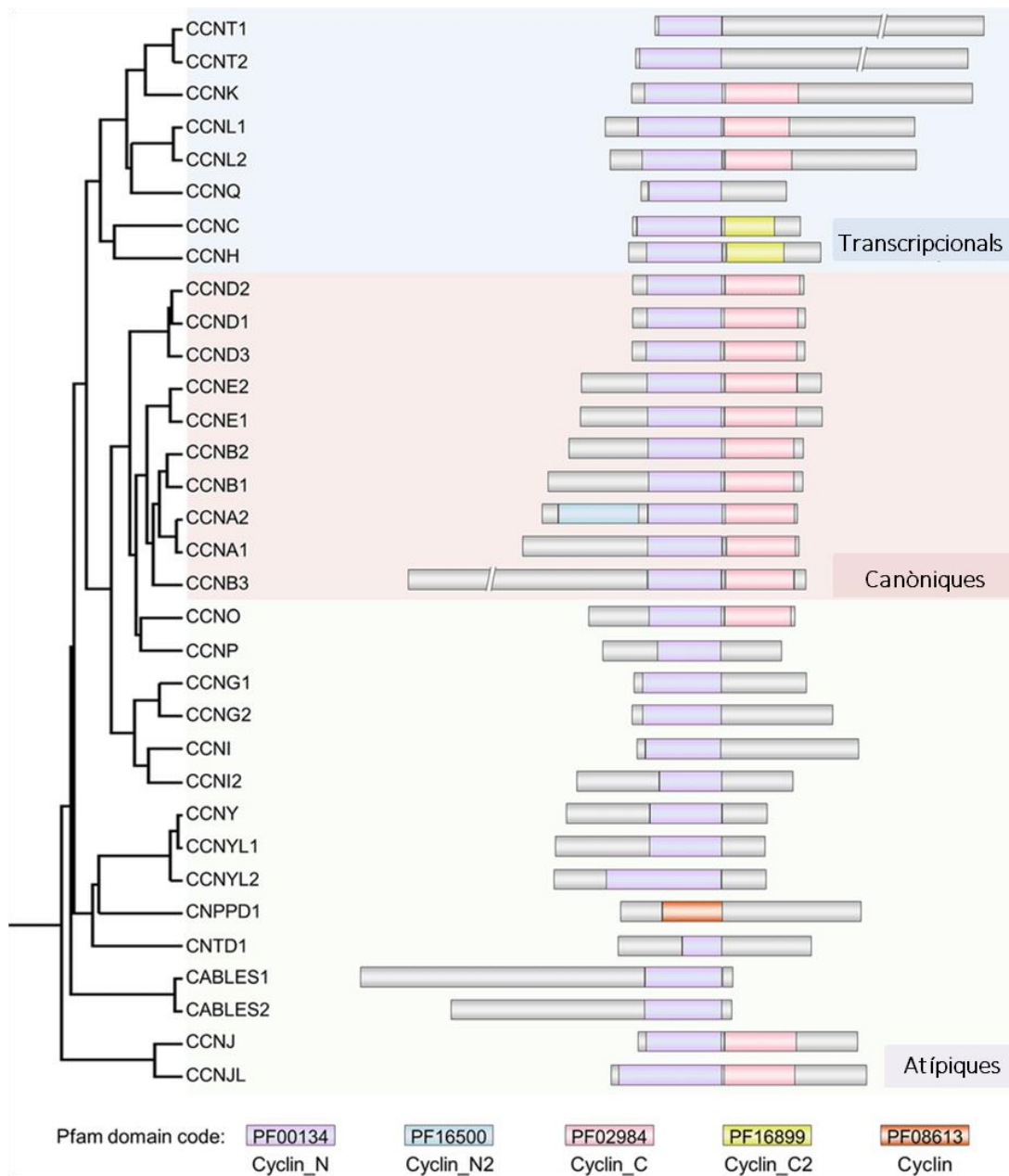


Figura 11. Estructura proteica de les ciclines humanes. Arbre filogenètic de les ciclines humanes. Adaptada de Quandt et al. 2020a.

#### 4.1. CCNI

CCNI (ciclina I), CCNG1 (ciclina G1) i CCNG2 (ciclina G2) formen un subgrup dins la família de les ciclines atípiques per similitud entre seqüències (Quandt et al., 2020a).

CCNI s'expressa majoritàriament en teixits post-mitòtics i la seva expressió es constant al llarg de totes les fases del cicle cel·lular (Nakamura et al., 1995). Per aquest motiu és considerava que aquesta ciclina no jugava un paper en la regulació de la divisió cel·lular. Però posteriorment, en un altre estudi es va observar un resultat contradictori,

presentant un pic d'expressió a la fase S. A més, cèl·lules amb CCNI silenciada disminueixen la seva proliferació i s'acumulen a G<sub>2</sub>-M (Nagano et al., 2013). CCNI regula la supervivència dels podòcits, essencials per la integritat del glomèrul renal (Griffin et al., 2006). També incrementa la proliferació de la línia cel·lular HeLa i línies cel·lulars de càncer de pulmó. Així que hi ha varies evidències que mostren que CCNI participa en el cicle cel·lular, tot i que encara no està clar si aquests efectes són mediat per una interacció amb CDK (Gasa et al. 2017; Nagano et al. 2013).

Mitjançant experiments d'expressió ectòpica s'ha pogut demostrar que CCNI interacciona i activa CDK5 retenint-la al nucli, en contrast de p35 que sembla retenir-la a la membrana plasmàtica (Hagmann et al., 2015; Kawai et al., 2007) Aquest complex activa i regula positivament les molècules anti-apoptòtiques Bcl-2 i Bcl-XL mitjançant la via MEK/ERK en cèl·lules diferenciades (Brinkkoetter et al., 2009).

En càncer d'ovari i tumors invasius de càncer de mama, CCNI es troba sobreexpressada. L'expressió de CCNI correlaciona amb la proliferació de línies cel·lulars tumorals i l'expressió de proteïnes relacionades amb l'angiogènesis, com VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) i VEGFR2 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*) (Cybulski et al., 2012a; Landberg et al., 2005). A més, la regulació a l'alça de CCNI proporciona resistència a cisplatí en línies cel·lulars de càncer d'ovari (Sherman-Baust et al., 2003) i càncer cervical (Li et al., 2015). En pacients amb adenocarcinomes pulmonars, nivells elevats de CCNI correlacionen amb un pitjor pronòstic (Gasa et al., 2017) i s'ha proposat que la presència del mRNA de CCNI a la saliva podria servir com a biomarcador pel càncer de pulmó (Zhang et al., 2012a).

## 5. RESULTATS PREVIS

En estudis previs del nostre grup es van detectar nous complexos CDK-ciclina mitjançant un assaig del doble híbrid en llevat (Y2H) (figura 12). Aquesta investigació va ser realitzada principalment per la Dra. Quandt i es pot consultar a la seva tesi (Quandt Herrera 2017; Quandt et al, manuscript submitted). En aquells estudis es va detectar una interacció entre CDK6-CCNI, que quantitativament semblava superior a l'existent entre la parella CDK5-CCNI descrita prèviament per altres grups (Hagmann et al., 2015; Li et al., 2015) i detectada també al nostre doble híbrid. La Dra. Quandt va validar el complex CDK6-CCNI mitjançant la tècnica del *trapping* en extractes de cervell de rata.

	CDK								
	4	5	6	10	14	15	16	17	18
CABLES1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCNG1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCNG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCNI	-	+++	+++	-	+	+	+	+	+
CCNJ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCNJL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCNO	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCNP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CCNY	-	-	-	-	+	+	+	+	+
CCNYL1	-	-	-	-	-	-	+	-	-
CNPPD1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CNTD1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SPY1	-	+	-	-	-	-	+++	+	+

Figura 12. Interaccions entre ciclines atípiques i CDKs monitoritzades per l'assaig del doble híbrid en llevat. La taula mostra les interaccions positives detectades entre CDK-ciclina remarcades en rosa (Quandt et al, manuscrit en revisió).

Aquest nou complex CCNI-CDK6 genera un especial interès, ja que CDK6 és una CDK canònica directament relacionada amb el control del cicle cel·lular i per tant, té un paper rellevant en càncer.

## HIPÒTESI

---

Hipòtesi

En el càncer encara hi ha processos que romanen incerts com el desconeixement de totes les vies cel·lulars implicades i els seus integrants. Per tant són necessàries futures investigacions per aportar llum a aquestes incògnites i ajudar així a desenvolupar teràpies efectives.

Per aquest motiu, la hipòtesis principal d'aquest estudi és que el complex CCNI-CDK6 pot jugar un paper determinat i desconegut en la proliferació cel·lular de certs tumors que ens permeti aportar més coneixement a la biologia del càncer.

A continuació s'exposen els objectius marcats per tal de poder demostrar-la.

Hipòtesi

## OBJECTIUS

---



Objectius

## OBJECTIU PRINCIPAL

---

Caracteritzar molecularment el complex CCNI-CDK6 i estudiar el paper que la seva desregulació pot tenir en la proliferació cel·lular en el càncer.

## OBJECTIUS ESPECÍFICS

---

1. Estudiar la interacció i activitat del complex CCNI-CDK6.
2. Estudiar l'efecte de la sobreexpressió de CCNI en models de cultius cel·lulars i *in vivo*.
3. Analitzar l'expressió de CCNI en pacients.
4. Determinar el mecanisme d'acció del complex CCNI-CDK6 en càncer.

Objectius

# MATERIAL I MÈTODES

---



## 1. CONSTRUCCIONS PLASMÍDIQUES

Les construccions es van realitzar mitjançant clonació per recombinació amb el kit In-FusionHD (Clontech, 639649) seguint les instruccions del protocol. Els inserts es van amplificar a partir de cDNA obtingut de les línies cel·lulars mitjançant un kit comercial (1708890, BioRad). Les proteïnes fusionades a GST es van obtenir per clonació de les mateixes en el vector pGEX6P1. Aquest vector d'expressió bacteriana permet que les proteïnes es sintetitzin fusionades a un GST N-terminal.

Les proteïnes d'expressió lentiviral es van obtenir mitjançant l'amplificació del cDNA de les ciclines d'interès en cèl·lules humanes A549 amb una etiqueta FLAG al C-terminal. En el cas de CCNI també es va produir amb una etiqueta FLAG al C-terminal fusionada directament o bé separada de la proteïna per 5 glicines. També es van realitzar diferents proteïnes de CCNI mutades amb l'etiqueta FLAG al C-terminal. Les seqüències dels oligonucleòtids utilitzats en aquest estudi es resumeixen a la taula 2.

Els cDNA obtinguts es van clonar al lloc de restricció de *PmeI* del vector d'expressió lentiviral pWPI (#12254, Addgene).

	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')
<b>CCNI-Flag</b>	GCCTCGAGGTTTAAACATGAAGTTTC CAGGGCCTTTG	GCCCGTAGTTTAAACCTACTTATCGT CGTCATCCTTGTAATCCATGACAGAA ACAGGCTG
<b>CCNI-5Gly-Flag</b>	GCCTCGAGGTTTAAACATGAAGTTTC CAGGGCCTTTG	GCCCGTAGTTTAAACCTACTTATCGT CGTCATCCTTGTAATCTCCTCCTCCTC CTCCCATGACAGAAACAGGCTG
<b>Flag-CCNI</b>	CCTCGAGGTTTAAACATGGATTACAA GGATGACGACGATAAGAAGTTTCCA GGGCCTTTG	GCCCGTAGTTTAAACCTACATGACA GAAACAGGCTG
<b>CCND1-Flag</b>	GCCTCGAGGTTTAAACATGGAACAC CAGCTCCTGTGCTGC	GCCCGTAGTTTAAACCTACTTATCGT CGTCATCCTTGTAATCGATGTCCACG TCCCGCAC
<b>CCNI R45A - Flag</b>	GAATGTTTCTCCATCCCAGGCAGATG AAGTAATTCAATGGCTG	CAGCCATTGAATTACTTCATCTGCCT GGGATGGAGAAACATTC
<b>CCNI K100A - Flag</b>	GTTTTTCTTAGCTGCCGCGACTGTT GAGGAAGATGAGAG	CTTCATCTTCTCAACAGTCGCGGC AGCTAGGAAAAAAC
<b>CCNI Δcaixa-ciclina - Flag</b>	GCCTCGAGGTTTAAACATGAAGTTTC CAGGGCCTTTG	GCCTCGAGGTTTAAACATGAAGTTT CCAGGGCCTTTGGAAAACCAGAGAT TGTCTTTCACAGCCACACCATTGGAT TTTC

Taula 2. Seqüències dels oligonucleòtids utilitzats.

### 2. EXPRESSIÓ I PURIFICACIÓ DE PROTEÏNES FUSIONADES A GST

Les proteïnes fusionades a GST, clonades al vector pGEX6P1, van ser transformades a *E. coli* RIPL. Es porten les cèl·lules a un creixement exponencial a 37°C durant 6 h. Després d'aquest temps, la temperatura es baixa a 18°C i s'afegeix 200 mM de IPTG (A4773, Applichem) per induir l'expressió de la proteïna durant 16 h.

El cultiu es centrifuga i el pellet es resuspèn en tampó de lisi. Tots els tampons utilitzats en aquest procés es resumeixen a la taula 3. Seguidament, s'afegeixen 125 µg/ml de liozima (L6876, Sigma Aldrich), 16,5 µg/ml de DNAsa I (A3778-0100, Panreac) i 16,5 µg/ml de RNAsa A (11579681001, Roche) i s'incuba a 37°C durant 10 min. Després d'aquest temps s'afegeix tampó STET 1x i les cèl·lules es soniquen (sonicador Dr. Hielscher, GmbH) durant 3 min a un 100% d'amplitud mantenint-les en gel. Un cop sonicades, les cèl·lules es centrifuguen a 10.000 rpm durant 10 min a 4°C. Passat aquest temps es recull el sobrenedant i s'incuba amb una resina de glutatió-sefarosa (GE Healthcare, 17-5132-01) prèviament equilibrada amb una barreja de tampó de lisi i tampó STET 10x. Es deixa el sobrenedant amb la resina 1 h a 4°C en rotació. Després es recupera la resina per centrifugació a 1000 rpm i es realitzen dos rentats amb una barreja de tampó de lisi i STET 10x i dos rentats més amb tampó d'equilibrat. Finalitzats els rentats eluïm dues vegades les proteïnes durant 20 min a 4°C amb tampó d'elució.

La quantitat i qualitat de les proteïnes purificades es va valorar mitjançant separació electroforètica en gels de poliacrilamida seguit per una tinció amb blau de Coomassie (1610787, Bio-Rad).

<b>Tampó de lisi</b>	50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 5% Glicerol, 0,1% Tritó X-100, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 100 mM PMSF, 10mg/ml Leupeptina, 1 mg/ml Pepstatina, 0,5 M Benzamidina
<b>Tampó STET 1x</b>	10 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 1µg/ml Leupeptina, 1µg/ml Pepstatina, 1 mM Benzamidina
<b>Tampó d'equilibrat</b>	50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM DTT
<b>Tampó d'elució</b>	50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM DTT, 10 mM L-Glutatió reduït (Sigma Aldrich, G4251)

Taula 3. Contingut dels tampons utilitzats.

### 3. CO-IMMUNOPRECIPITACIÓ

Es prepara el volum adequat d'extracte cel·lular per a que contingui entre 1-2 mg de proteïna i s'incuba amb 20 µl d'esferes magnètiques (88846, Pierce, Thermo Fisher

Scientific) amb l'anticòs  $\alpha$ -Flag (F3165, Sigma Aldrich) durant 14-15 h a 4°C en rotació. Passat aquest temps, es renten les esferes mitjançant un suport imantat per eliminar unions inespecífiques. Es realitzen dos rentats amb tampó de lisi seguits per un rentat amb aigua ultra pura. S'afegeix 20  $\mu$ l d'aigua ultra pura i 5  $\mu$ l de tampó SDS-SB5x per eluir les proteïnes i s'incuben les mostres 10 min a 30°C.

#### 4. ASSAIG DE FOSFORILACIÓ *IN VITRO*

Els assajos de fosforilació *in vitro* d'aquesta tesi es basen en el protocol descrit pel grup del Dr. Shokat (Universitat de Califòrnia, San Francisco, CA) (Blethrow et al. 2008). Aquest mètode utilitza un ATP modificat que implica una substitució tiol en el fosfat gamma de l'ATP. La cinasa durant la reacció utilitza aquest ATP- $\gamma$ -S de manera que els seus substrats queden marcats amb un tiofosfat. Mitjançant l'alquilació d'aquestes proteïnes amb un grup tiol, es genera un éstertiofosfat que es pot reconèixer mitjançant l'ús d'un anticòs específic (figura 13).

Les GST-CDKs i les GST-ciclins (0,4  $\mu$ M) quantificades mitjançant tinció amb Coomassie es pre-activen utilitzant 0,04  $\mu$ M de CAK humana (Sigma Aldrich) en una solució de volum final 30  $\mu$ L que conté 500 mM de Tris-HCl a pH 7,5, 100 mM de MgCl<sub>2</sub> i 1 mM d'ATP (Sigma-Aldrich) a 30°C durant 30 min. Les mostres es transfereixen a una unitat de centrifugació amb filtre de 30K (Millipore) per canviar el tampó. Seguidament s'afegeix 1  $\mu$ M de GST-pRb al medi de reacció que conté 500 mM d'HEPES a pH 7,5, 500 mM de NaCl, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM d'EGTA, 10 mM de DTT i 1 mM d'ATP- $\gamma$ -S (BLG-A060-05, Axxora) en presència i absència d'inhibidors CDK4/6 a 30 °C durant 45 min. Les reaccions es paren amb l'adició de 50 mM d'EDTA i s'incuben amb 0,5 mg/ml de PNBM proporcionat amablement per Kevan M. Shokat, a 25 °C durant 45 min. Finalment s'afegeix tampó SDS-SB5x a les mostres i es comprova la tiofosforilació mitjançant WB.

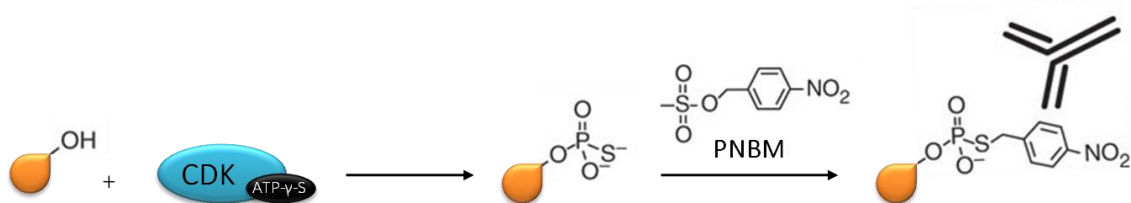


Figura 13. Seqüència de reacció per etiquetar el substrat de la cinasa.

#### 5. ASSAIG DE FOSFORILACIÓ FLUORESCENT

Els assajos de fosforilació fluorescent d'aquest estudi es basen en el protocol descrit pel grup de Morris (Soamalala et al., 2021). Els assajos es duen a terme utilitzant un pèptid biosensor fluorescent específic de CDK6 (CDKACT6). El biosensor és un



## Material i mètodes

polipèptid modular sintètic que combina una regió del substrat específic de la cinasa en concret conjugat a un colorant sensible a l'ambient (TAMRA), juntament amb un domini d'unió a fosfoaminoàcids, que reconeix específicament el substrat quan es fosforila per la cinasa corresponent. L'activitat de la cinasa i la fosforilació del biosensor es detecten a través de canvis sensibles en la intensitat de la fluorescència associats a la unió del domini d'unió a fosfoaminoàcids al substrat afectant l'entorn del colorant associat (figura 14).

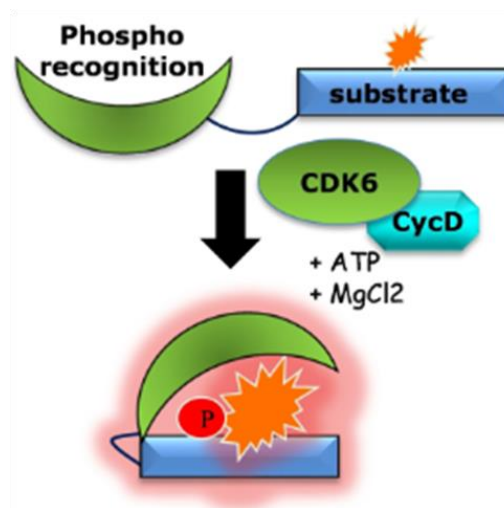


Figura 14. Representació esquemàtica del pèptid biosensor CDKACT6. Imatge de Soamalala et al., 2021.

Els extractes cel·lulars (40 µg) s'incuben amb 200 nM de CDKACT6-TAMRA, cedit amablement pel grup de la Dra. Morris (Universitat de Montpel·lier, França) en una solució de tampó fosfat salí (PBS) 1x de volum final 200 µl que conté 5 mM de MgCl<sub>2</sub> i 0,5 mM d'ATP en una placa fosca de 96 pouets. Els canvis en l'emissió de fluorescència de TAMRA es recullen cada 90 seg a 570 nm després d'excitar a 544 nm durant 2 h a 30 °C al lector de plaques *Synergy HT*. La fluorescència relativa es calcula restant la fluorescència de CDKACT6-TAMRA a la auto-fluorescència del extracte cel·lular.

## 6. LÍNIES CEL·LULARS I REACTIUS

Les cèl·lules HEK293T, A549, MDA-MB-231, MCF7, BT-474, MDA-MB-468, LoVo i HT-29 es van cultivar en DMEM (D5671, Sigma-Aldrich) suplementat amb un 10 % de FBS (FBS-12A, Capricorn Scientific) desactivat, un 1% de glutamax (Biowest) i un 1 % de penicil·lina/estreptomicina (P0781, Sigma-Aldrich). Les cèl·lules ChaGo-K-1, HCA-7, H1437 i Du145 es van cultivar en RPMI-1640 (R8758, Sigma-Aldrich) suplementat amb un 10 % de FBS desactivat i un 1 % de penicil·lina/estreptomicina. A les línies cel·lulars ChaGo-K-1 i HCA-7, a més es va suplementar un 1 % de glutamax i 1 mM de piruvat de sodi al medi. A les Du145 es va afegir un 1 % d'aminoàcids no essencials. Totes les

cèl·lules es van mantenir a 37 °C en ambient humit amb un 5 % de CO<sub>2</sub>. L'absència de contaminació per micoplasma es va monitorar periòdicament per PCR.

El palbociclib es va obtenir a Sigma-Aldrich.

## 7. EXTRACCIÓ I QUANTIFICACIÓ DE PROTEÏNES DE LINIES CEL·LULARS

Per l'extracció de proteïnes es realitza un rentat amb PBS 1x fred a les cèl·lules i, a continuació s'afegeix tampó de lisi suplementat amb inhibidors de fosfatases (88667, Thermo Fisher Scientific) i proteases (88266, Thermo Fisher Scientific). Les cèl·lules es desenganxen mitjançant *scrapping* i es mantenen en gel durant 10 min, després es soniquen i es clarifiquen per centrifugació a 13500 rpm a 4 °C durant 15 min.

- Tampó de lisi: 20 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 5mM EDTA pH 8, 1 % NP40.

Per la quantificació de les proteïnes es realitza una recta patró amb BSA amb concentracions de 0 µg/µl a 10 µg/µl en una placa de 96 pouets. A continuació s'afegeix 1 µl per duplicat de cadascuna de les mostres i finalment s'afegeix 200 µl de *Bradford* (5000205, BioRad) a cadascun dels pouets. Es mesura l'absorbància a 595 nm passats 5 min de reacció al lector de plaques *Synergy HT* (Biotek).

## 8. WESTERN BLOT

Un cop realitzada la quantificació de proteïna pel mètode de *Bradford* (5000205, BioRad), les diferents mostres preparades en tampó SDS-SB5x es calenten a 90 °C durant 5 min. Les proteïnes es separen per electroforesi en gel de SDS-poliacrilamida i es transfereixen a una membrana de PVDF (IPVH00010, Immobilo-P, Millipore). Seguidament, la membrana es bloqueja durant 30 min amb tampó salí Tris suplementat amb Tween-20 (TBS-T) amb un 5% de llet en polsi s'incuba amb l'anticòs primari corresponent durant tota la nit a 4 °C en rotació. Els anticossos primaris utilitzats queden recollits a la taula 4.

Després de rentar les membranes amb TBS-T, aquestes s'incuben amb els respectius anticossos secundaris conjugats amb peroxidasa de rave (HRP; Jackson Laboratories) durant 1 h a temperatura ambient. Després de rentar les membranes es revelen mitjançant *Luminata Forte Western HRP Substrate* (WBLUF0500, Millipore) i les imatges es capturen mitjançant *GeneSnap* (Syngene). Per normalitzar l'expressió proteica es va utilitzar la tinció amb *Ponceau* (Sigma-Aldrich).

## Material i mètodes

Anticòs	Dilució	nº catàleg i casa comercial
$\alpha$ -CDK5	1:500	sc-6247, Santa Cruz Biotechnology
$\alpha$ -CDK6	1:2000	13331, CellSignaling
$\alpha$ -CCNI	1:1000	GTX125941, GeneTex
$\alpha$ -CCND1	1:200	sc-20044, Santa Cruz Biotechnology
$\alpha$ -pRb	1:500	554136, BD Pharmingen
$\alpha$ -pRB fosfo-S780	1:1000	9307, CellSignaling
$\alpha$ -p16	1:1000	D7C1M, Cell Signaling
$\alpha$ -ésteritiofosfat	1:5000	ab92570, Abcam
$\alpha$ -Flag	1:500	F3165, Sigma-Aldrich
$\alpha$ -GST	1:10000	CSB-MA000021MOM, CusAb
$\alpha$ -GFP	1:1000	2956, Cell Signaling

Taula 4. Anticossos utilitzats per al Western Blot.

## 9. PRODUCCIÓ DE VIRUS, TITULACIÓ I TRANSDUCCIÓ

Per la producció lentiviral de les construccions descrites al punt 1 es sembren cèl·lules HEK293T en plaques de 100 mm a una confluència del 80 % i es transfecten amb fosfat càlcic i 45  $\mu$ g del DNA plasmídic. Breument, el DNA plasmídic es barreja amb 12,9  $\mu$ g de pMD2G, 29,1  $\mu$ g de psPAX2, 1,3 ml de tampó TE 0,1x, 727  $\mu$ l d'aigua tamponada i 223  $\mu$ l de CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM. A aquesta mescla s'afegeix 2,25 ml de HeBS 2x gota a gota mentre es vorteja vigorosament. Es deixa a temperatura ambient durant 15 min i posteriorment s'afegeix gota a gota damunt la placa de cultiu. 14 h després es reemplaça el medi de cultiu per medi fresc. Els virus quedaran als sobrenadants, que es recolliran cada 8-12h fins 48h després de la transfecció. Aquests es concentren utilitzant les columnes *Sartorius VS2042 Vivaspin 20* (Sartorius) i es titulen els virus utilitzant la línia cel·lular HEK293-T mitjançant la detecció de GFP amb citometria de flux (BD FACS Calibur Flow Cytometer).

- TE 0,1x: 1 mM Tris-HCl pH 8, 0,1 mM EDTA.
- Aigua tamponada: 2,5 mM HEPES pH 7,3.
- HeBS 2x: 50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, ajustat a pH 7 amb NaOH.

Pels estudis de sobreexpressió, cada línia cel·lular es infectada amb la MOI corresponent resumides a la taula 5 mitjançant l'ús de *Polybrene* (TR-1003, Sigma-Aldrich).

Línia cel·lular	MOI
MDA-MB-231	5
MCF7	7,5
BT-474	7,5
MDA-MB-468	10
A549	7,5
ChaGo-K-1	20
H1437	20
LoVo	5
HT-29	5
HCA-7	5
Du145	20

Taula 5. MOI utilitzada per cada línia cel·lular.

## 10. ASSAJOS DE VIABILITAT I DE PROLIFERACIÓ CEL·LULAR

Per estudiar la viabilitat cel·lular s'utilitza la tècnica del MTT (Bromur de 3-(4,5-Dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli). Es sembren les cèl·lules a la densitat corresponent i s'infecten amb la MOI adequada en plaques de 24 pous. Passats 5 dies, les cèl·lules són incubades amb la solució de MTT (5655, Sigma) durant 1 h a 37°C. Seguidament, els cristalls de formazan es dissolen DMSO i es quantifiquen mesurant l'absorbància a 570 nm al lector de plaques *Synergy HT* (Biotek). La reducció de MTT s'expressa com a percentatge de l'absorbància obtinguda al control que es considera el 100%.

Per estudiar la proliferació cel·lular s'utilitza el kit colorimètric de BrdU (11647229001, Roche). Les cèl·lules es sembren a la densitat corresponent i s'infecten amb la MOI adequada en plaques de 96 pouets. 5 dies després, s'incuben les cèl·lules amb BrdU seguint les instruccions del protocol de la casa comercial. La incorporació de BrdU es quantifica mesurant l'absorbància a 370 nm al lector de plaques *Synergy HT* (Biotek). La incorporació de BrdU s'expressa com a percentatge de l'absorbància obtinguda al control que es considera el 100%.

## 11. FORMACIÓ DE COLÒNIES

Pels assajos de formació de colònies, les línies cel·lulars MDA-MB-231 (750 cèl·lules/ml), A549 (500 cèl·lules/ml) i LoVo (800 cèl·lules/ml) es sembren en plaques de 6 pous i es deixen a l'incubador durant 14 dies. Finalitzat aquest període de temps, les colònies formades es fixen amb metanol al 100% fred durant 5 min, es renten amb PBS

## Material i mètodes

1x i es tenyeixen amb cristall violeta al 0,1% en metanol durant 30 min a temperatura ambient i a la foscor. Finalment es compta el nombre de colònies o bé, es mesura la quantitat de cristall violeta. En el primer cas, el recompte de colònies es dur a terme mitjançant la imatge del pou corresponent amb el programa *GeneTools* (Syngene). En el segon cas, la quantitat de cristall violeta s'extreu amb àcid acètic al 10% i es mesura l'absorbància a 490 nm al lector de plaques *Synergy HT* (Biotek). En ambdós casos, els resultats es representen com a percentatge del control.

## 12. TRANSFECCIÓ siRNA

Les cèl·lules es sembren i s'infecten a la densitat adequada i el dia següent es transfecten amb el siRNA de CDK6 (cadena de sentit: GAUGUUGAUCA ACUAGGAAAAAUCT; cadena antisentit: AGAUUUUUCCUAGUUGAUCAACAUCUG), CDK5 (J-003239-09 i J-003239-10, Dharmacon) o el control negatiu (51-01-14-04, IDT) utilitzant Lipofectamina 2000 (11668-027, Thermo Fisher Scientific). Les cèl·lules s'aixequen 48 h després i es sembren per l'assaig de formació de colònies. Per comprovar els efectes del silenciament del gen corresponent mitjançant la incorporació de BrdU a les 72 h després de la transfecció, les cèl·lules es sembren i es transfecten el dia següent amb el siRNA de CCNI (SASI\_Hs01\_00052222, Sigma-Aldrich), CCND1 (L-003210-00, siRNA SMARTPool, Dharmacon), pRb (L-003296-02, siRNA SMARTPool, Dharmacon) o el control negatiu.

## 13. EXTRACCIÓ DE RNA I PCR QUANTITATIVA EN TEMPS REAL (RT-qPCR)

L'extracció de RNA es realitza mitjançant l'ús de Trizol (Invitrogen) seguint les instruccions del protocol de la casa comercial. Breument, les cèl·lules es solubilitzen amb Trizol, s'afegeix cloroform fred i se separa la fase superior on hi ha el RNA mitjançant la centrifugació de les mostres a 13.400 rpm 15 min a 4 °C. Seguidament es precipita el RNA amb isopropanol fred i centrifugació a 13.400 rpm 15 min a 4 °C. Es realitza un rentat del pellet de RNA amb etanol fred al 75 % i es deixa evaporar durant 40 min a temperatura ambient. El pellet es resuspèn en aigua DEPC i es determina la puresa i quantitat al lector *Synergy HT* amb la placa *Take3 Plate* (242821, BioTek).

El DNA complementari (cDNA) es sintetitza a partir de 1 µg de RNA total purificat mitjançant 2 µl de l'enzim M-MuLV (F83902-1, Lucigen) en una solució de 0,5 µl de Random RT primers (79236, Qiagen), 4 µl de dNTP 10 mM (GC-013-004, GeneCraft), 2 µl de RT buffer (F88903-1, Lucigen) i 0,5 µl d'inhibidor de RNasa (30281-1, bioNova) en un volum final de 20 µl. La reacció s'incuba a 37 °C durant 1 h. La PCR quantitativa

(qPCR) es realitza amb 20 µg de cDNA, 1µl dels encebadors 10 µM i 6 µl de SYBR Green I Master Mix (1725281, BioRad) en un volum final de 20 µl. Els valors obtinguts són normalitzats amb el 18S i calculats seguint la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Els encebadors utilitzats es troben a la taula 6.

Gen	Forward (5' → 3')	Reverse(5' → 3')
DCK	CCACCCCGCCCAAGAG	CTTCCCTGCAGCGATGTTCCC
SMC3	CAGCAAAGTGGAGGTACAATCCCA	CCGATGGCTGACTTGGTCAC
PAICS	GTCTTCTCTTCGACTACCCAGTGG	CAAATTGAGCTGATCCTTCTGGA
USP1	ACAGTCCTTAATCATTTCGGTTGA	GGAGTTGGCATGTTTCTTGAATGT
CTCF	TTACACGTGTCCACGGCGTTC	GCTTGTATGTGTCCCTGCTGGCA
TMPO	TGCTCGCCTCCTGCCTGTAG	GACACAAAGCCAAGCCAGACC
RAD21	AGCGTGATGTTATCGATGAGCC	TTAACTCCCTGAGGTGGTGGTG
TRA2β	TCCAGAAGAAGCTCCGAAG	TCTTGAACGCCTAGACTGCT
CCNI	CCGTAAAGGCTCATCCAAAA	GGCTGTGTGAAGATCCCAAT
CCND1	CCGTCCATGCGGAAGATC	GAAGACCTCCTCCTCGCACT
18S	CTACCACATCCAAGGAAGGCA	TTTTTCGCTACTACCTCCCCG

Taula 6. Encebadors utilitzats en la PCR quantitativa.

## 14. MODEL ORTOXENÒGRAF TUMORAL

El model ortoxenògraf tumoral es va fer en col·laboració amb el grup del Dr. Alberto Villanueva (ICO-IDIBELL, Barcelona, Espanya). Set ratolins femella sense timus (CrI:NU-Foxn1nu) de 5 setmanes de vida (Envigo, Italy) se'ls va injectar ortotòpicament al pannicle adipós mamari un total de  $3 \times 10^6$  cèl·lules de la línia cel·lular MDA-MB-231 infectades prèviament amb el vector buit o el vector lentiviral que expressa CCND1 o CCNI. El creixement tumoral es va monitoritzar durant 39 dies, mesurant la llargada (L) i amplada (W) del tumor fins que els ratolins van ser sacrificats 39 dies després de la injecció. El volum del tumor ( $\text{mm}^3$ ) es va estimar a través de la fórmula  $V = \pi / (6 \times L \times W^2)$ . Un cop sacrificats els ratolins, es van disseccionar els tumors i es van pesar. Tots els experiments amb ratolins van ser aprovats pel Comitè de Cura Animal de l'IDIBELL (procediment 9111) i els protocols utilitzats es van dur a terme d'acord les directrius aprovades.

## 15. ANÀLISI ESTRUCTURAL BIOINFORMÀTIC

L'anàlisi estructural es va fer en col·laboració amb el grup del Dr. Jordi Villà (Universitat de Vic, Catalunya, Espanya) i l'estratègia seguida es descriu breument a continuació. La recerca del banc de dades proteic (PDB) es va dur a terme utilitzant la "funció molecular" del terme "unió a ciclina" (GO ID: 30332). Es van trobar 577 models

## Material i mètodes

que contenen estructures de ciclines dels quals només 10 estructures de les CDKs humanes s'unien a ciclines (codis PBD: 1F5Q, 1W98, 2F2C, 2JGZ, 2W96, 3G33, 3MI9, 3QHW, 4EOJ). Per cada complex, es va definir uns residus interfase amb més del 20% de no unió a l'àrea de la superfície accessible solvent (SASA) ocults per la complexitat. Les posicions d'interfase comunes presents en tots els complexos CDK-ciclina es van definir d'un alineament de seqüències múltiple dut a terme amb el programa MAFFT. El mapa de contactes entre cadena es va calcular amb el *shadow map algorithm* que defineix tant el conjunt d'interaccions comunes entre CDK-ciclina com tots els contactes entre cadena en tots els 10 complexos CDK-ciclina.

L'estructura del complex CDK6-CCNI es va generar utilitzant els càlculs d'acoblament proteïna-proteïna. El model comparatiu de CCNI es va acoblar a l'estructura cristal·logràfica de CDK6 (codi PBD: 2F2C) utilitzant el protocol d'optimització local *Rosetta Dock*. Les distàncies entre cadena, pertanyents a contactes conservats en força complexos CDK-ciclina es van introduir durant l'optimització per mantenir la correcta orientació entre les dues cadenes. Totes les distàncies es van contenir entre els àtoms de carboni alfa i els parells inclosos L97-I59, K100-E52, K100-G53, K100-M54, K100-L56, K100-I59, T101-I59, T101-A63, E106-R60, L111-E52, E131-E52, E131-G53, E131-M54, L135-M54, W140-M54, W140-I59, W140-V62, W140-L94, L142-I59, L142-A63 i H143-A63 amb la primera posició de CCNI i la segona de CDK6 (els nombres corresponen a les entrades d'Uniprot id:Q14094 per CCNI i id:Q00534 per CDK6).

## 16. ANÀLISI KAPLAN-MEIER

Les corbes de supervivència s'han generat a partir de les dades de pacients de la base de dades de la web *Kaplan-Meier* (<http://kmplot.com/analysis/>). Els pacients van ser dividits mitjançant la mitja d'expressió de CCNI entre grups d'alta o baixa expressió i la supervivència general es va representar en gràfics de *Kaplan-Meier*.

## 17. ANÀLISI DEPMAP I TCGA

Les dades d'expressió gènica del portal *Depmap* (<https://depmap.org/portal/>) es van usar per dur a terme un anàlisi de correlació entre l'expressió de CCNI i la resta del exoma en línies cel·lulars. Els primers 1.000 gens amb un p-valor  $\leq 1,83e^{-31}$  i una correlació de Spearman  $\geq 0,3$  van ser seleccionats per un anàlisi d'enriquiment d'un set genètic utilitzant el portal GSEA. Per l'anàlisi d'expressió gènica en pacients amb càncer es van usar les dades del TCGA, una base de dades de genòmica del càncer que ha caracteritzat molecularment més de 20.000 càncers primaris i les ha emparellat amb mostres normal que abasteix 33 tipus de càncers diferents.

Es va realitzar un *ranking* de les mostres considerant l'expressió gènica objectiu i es van dividir en 4 grups equivalents. Les comparacions es van dur a terme entre mostres amb el major i menor 25% d'expressió.

### 18. ANÀLISI ESTADÍSTIC

Sempre que no s'indiqui el contrari, els valors es representen amb la mitjana  $\pm$  l'error estàndard de la mitjana (SEM) tenint en compte els p-valor següents: \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$ .

El test estadístic utilitzat per tots els experiments amb línies cel·lulars és el test de Mann-Whitney. S'ha utilitzat el programa *GraphPad Prism 5*.





## RESULTATS

---

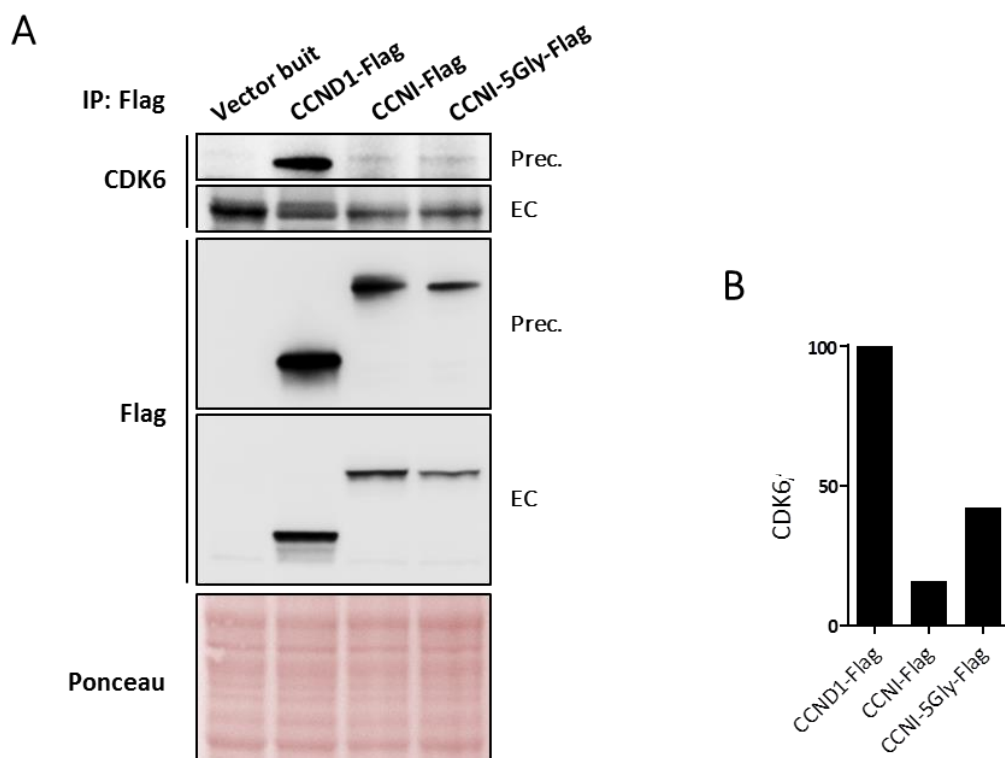
## Resultats

## CAPÍTOL 1. CARACTERITZACIÓ BIOQUÍMICA DEL COMPLEX CDK6-CCNI

Resultats preliminars del nostre grup van demostrar que CCNI és un interactor de CDK6 en el sistema de Y2H. La interacció es va validar en el seu moment mitjançant estratègies de *trapping* en extractes cel·lulars (Quandt Herrera, 2017). A partir d'aquí es va voler estudiar el complex CDK6/CCNI mitjançant altres tècniques. En la majoria d'aquestes aproximacions s'ha inclòs com a control positiu CCND1, per ser una parella ben coneguda de CDK6 i a causa de l'evidència que recolza el seu paper en càncer i la seva major caracterització funcional existent en comparació a CCND2 i CCND3.

### 1.1. CCNI interacciona amb CDK6

Primerament, es va voler corroborar si CCNI interacciona amb CDK6 en extractes cel·lulars, per això es va realitzar un experiment de Co-Immunoprecipitació (Co-IP) a partir d'extractes cel·lulars que sobreexpressen CCNI (figura 15).



**Figura 15. CDK6 interacciona amb CCNI.** (A) Cèl·lules A549 van ser transduïdes amb el vector d'expressió pWPI (vector buit) i la construcció indicada. A les 96h d'infecció, l'extracte cel·lular es va sotmetre al procés de Co-IP utilitzant l'anticòs anti-Flag. La interacció amb CDK6 va ser analitzada mitjançant WB utilitzant un anticòs anti-CDK6. EC (extracte cel·lular) correspon a un 2% de la quantitat total de la proteïna utilitzada per la Co-IP. (B) Quantificació de l'assaig després de la normalització amb la quantitat de proteïna precipitada. La quantitat de CDK6 precipitada amb CCND1-Flag es va considerar el 100%.

## Resultats

La Co-IP es va realitzar en cèl·lules A549 en les quals es va sobreexpressar CCNI marcada amb dues etiquetes diferents (Flag o 5-Gly-Flag) per comprovar si la posició d'aquests podia influir en la immunoprecipitació.

A la figura 15A s'observa que CDK6 co-precipita amb CCNI independentment de l'etiqueta expressada, i en aquest cas interacciona d'una manera més feble que CDK6-CCND1 en les condicions testades.

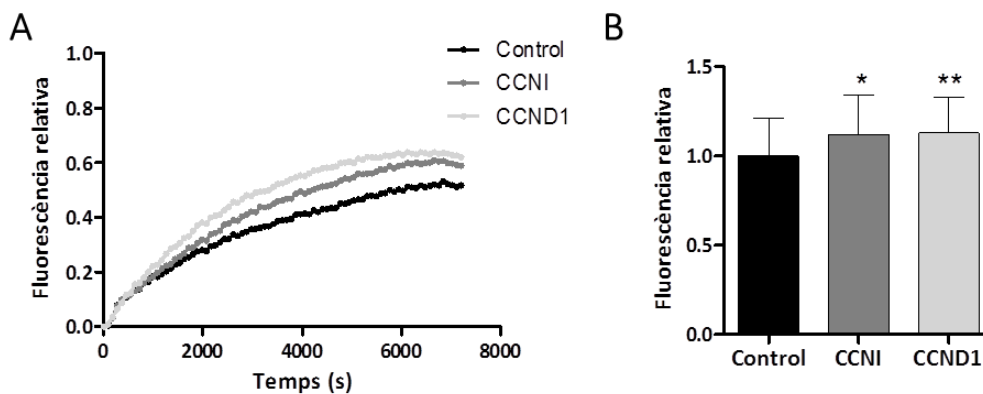
### 1.2. El complex CDK6-CCNI és actiu

Ja que la interacció entre CDK6-CCNI no havia estat reportada per altres grups primerament es va comprovar si el complex és actiu.

Com a primera aproximació es va seguir l'estratègia del grup de Morris (Soamalala et al., 2021) en el qual s'utilitza un pèptid biosensor fluorescent (CDKACT6) que permet determinar l'activitat de CDK6 en extractes cel·lulars en front d'altres cinases.

El pèptid CDKACT6 és un polipèptid modular sintètic que combina una regió del substrat específic d'una cinasa, conjugat a un colorant sensible a l'ambient (TAMRA) i un domini d'unió a fosfoaminoàcids, que reconeix específicament el substrat quan es fosforila per la cinasa (figura 14). Canvis en la intensitat de la fluorescència permeten determinar l'activitat de la cinasa.

Per aquest propòsit s'han utilitzat extractes cel·lulars de MDA-MB-231 que sobreexpressen CCNI i CCND1.



**Figura 16. Activitat de CDK6 en MDA-MB-231.** (A) Imatge representativa de la fluorescència relativa del pèptid biosensor CDKACT6-TAMRA incubat amb 40 µg d'extractes cel·lulars de MDA-MB-231 transduïdes amb plasmidis lentivirals buit o amb les construccions de ciclines indicades. (B) Representació dels valors de la fluorescència relativa obtinguda a 6.000 segons. Les columnes representen la mitjana ± SEM de cinc experiments independents realitzats per triplicat. \*p < 0,05 i \*\*p < 0,01 vs control, prova t aparellada.

Els extractes cel·lulars de MDA-MB-231 que sobreexpressen CCNI incubats en presència del pèptid fluorescent esmentat, presenten un 20% més de fluorescència en

comparació al control, indicant que tenen més activitat CDK6. Cal remarcar, que s'obté un nivell similar de fosforilació que els extractes de la mateixa línia que sobreexpressen CCND1 (figura 16A i 16B). Això, indirectament pot suggerir que la potencia d'activació de CCNI i CCND1 seria similars.

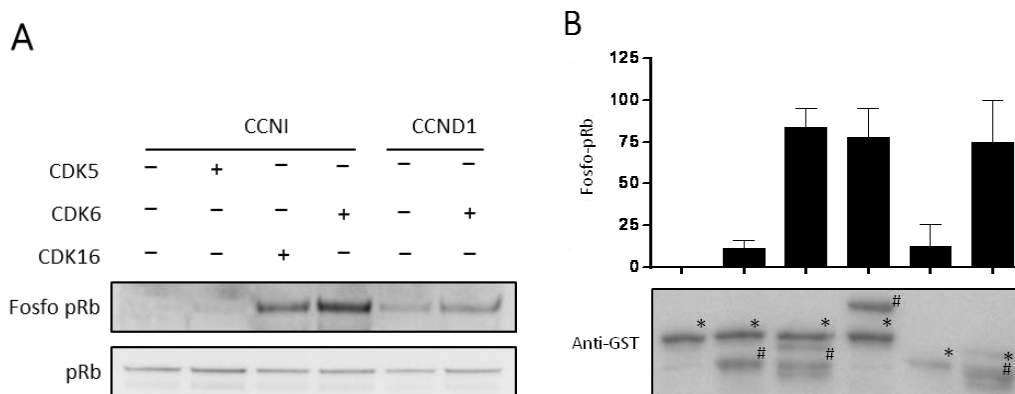
### 1.3. pRb es fosforila pel complex CDK6-CCNI *in vitro*

Un cop determinat que el complex és actiu es va determinar si es capaç de fosforilar la proteïna pRb, el substrat fisiològic de CDK6 quan es troba associada amb CCND durant la fase G<sub>1</sub> del cicle cel·lular. A l'assaig també es van afegir les altres CDKs que interaccionen amb CCNI que varen ser detectades al cribratge dut a terme pel nostre grup (Quandt Herrera, 2017).

Es van expressar les diferents proteïnes en *E. coli* amb un GST situat en N-terminal, per una posterior purificació mitjançant la unió d'esferes glutatió-sefarosa.

Els assajos de fosforilació *in vitro* es van dur a terme seguint l'estratègia descrita pel grup de Shokat (Blethrow et al., 2008). Aquest sistema utilitza un ATP modificat que consisteix en una substitució tiol al fosfat gamma (ATP-γ-S). Això permet que la cinasa transfereixi el tiofosfat als seus substrats permeten que puguin ser detectats amb un anticòs específic anti-éstertiofosfat (figura 13).

A la figura 17 es mostra com el complex CDK6-CCNI és capaç de fosforilar pRb *in vitro* de manera similar al complex CDK6-CCND1. Aquests resultats indicarien, per tant, que el complex interactua i a més, és actiu. A més, el complex CCNI-CDK16 també és capaç de fosforilar pRb, això aniria en concordança amb estudis previs en els que s'observa que CDK16 es capaç de fosforilar pRb (Phadke et al., 2018).



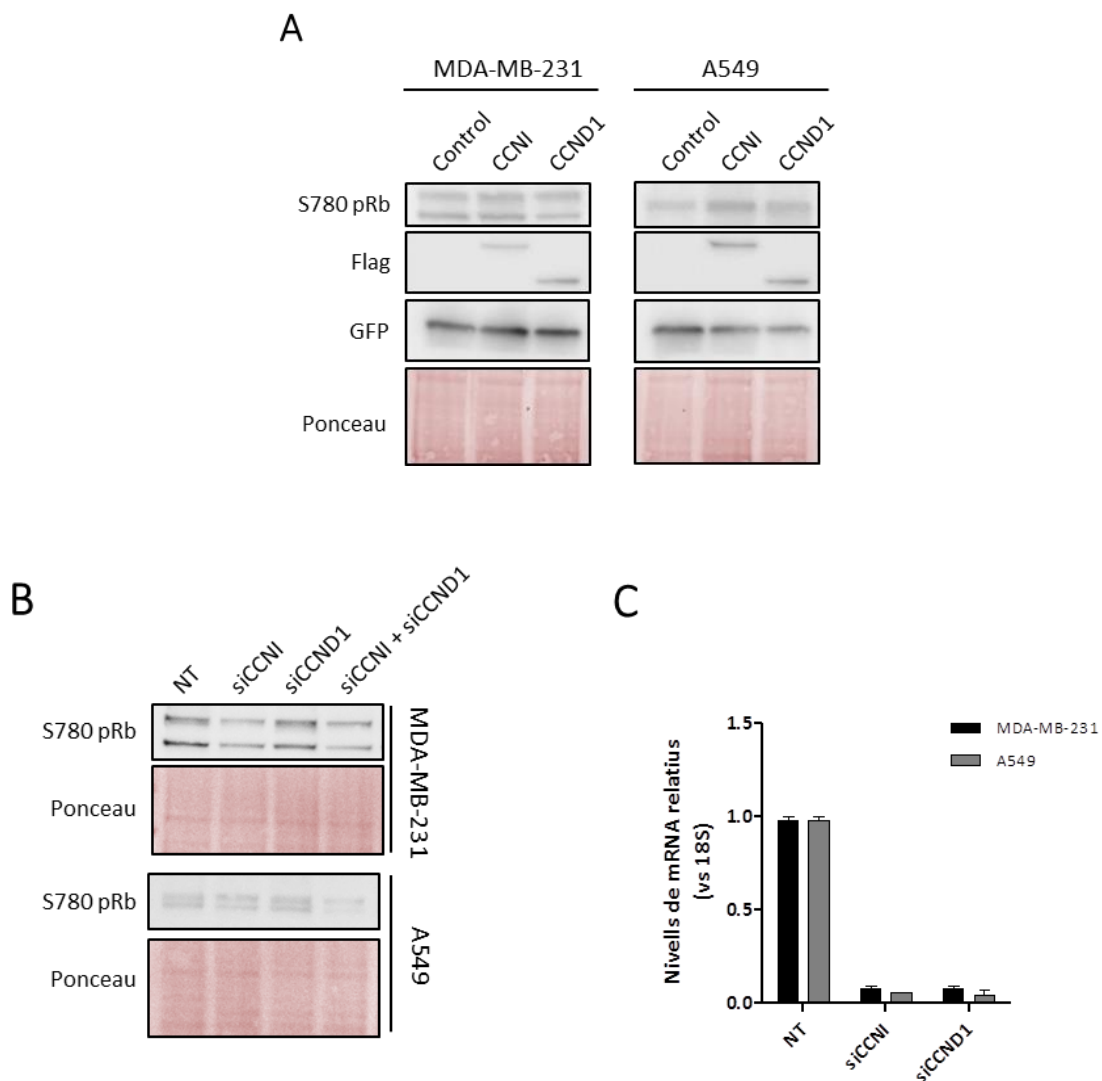
**Figura 17. Fosforilació de pRb *in vitro*.** (A) Assaig cinasa *in vitro* utilitzant CDKs, ciclines i pRb recombinants, purificats de *E. coli*. La fosforilació va ser detectada mitjançant un anticòs anti-éstertiofosfat. (B) Quantificació de l'assaig cinasa. S'ha representat en el mateix ordre que l'assaig cinasa. Les columnes representen la mitjana ± SEM almenys de dos experiments independents. L'anti-GST indica les quantitats de ciclina (\*) i CDK (#) utilitzades per l'assaig.

## Resultats

### 1.4. CCNI influeix en la fosforilació de pRb en extractes cel·lulars

Fins al moment, hem corroborat la fosforilació de pRb pel complex CDK6-CCNI *in vitro*. Seguidament es va investigar si aquesta fosforilació de la proteïna pRb varia en extractes cel·lulars. Per comprovar aquesta idea primerament, es van detectar els nivells de fosforilació de la proteïna pRb en extractes cel·lulars de MDA-MB-231 i A549 que sobreexpressen CCNI i CCND1.

A la figura 18A es pot observar que la serina 780 de la proteïna pRb, serina fosforilada específicament per CDK6, és fosforilada de manera similar tant en extractes que sobreexpressen CCNI com CCND1 amb una intensitat similar que el control.

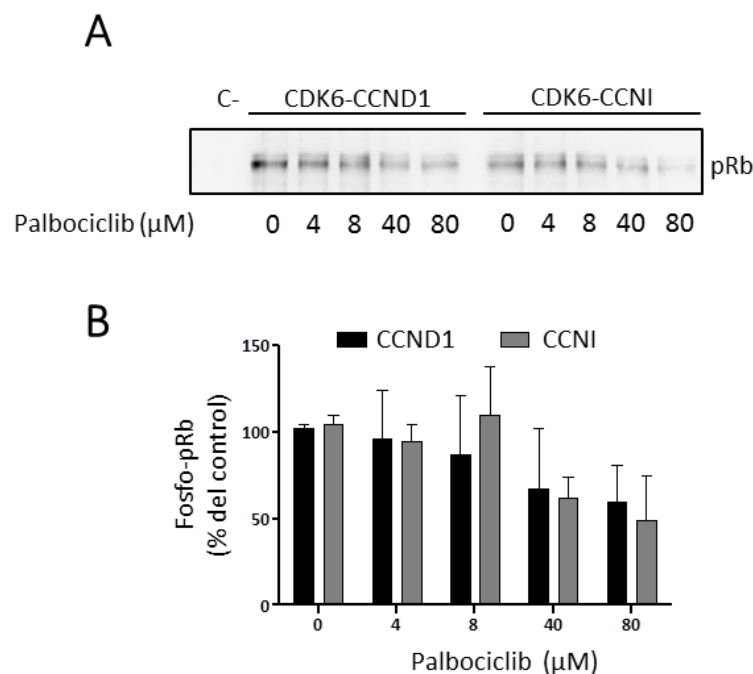


**Figura 18. Nivells de fosforilació de pRb.** (A) *Western Blot* d'extractes cel·lulars de MDA-MB-231 i A549 infectats amb el vector lentiviral buit o les construccions de les ciclines indicades. (B) *Western Blot* d'extractes cel·lulars de MDA-MB-231 i A549 transfectades amb siRNA control o de les ciclines indicades. Es va utilitzar un anticòs anti-fosfoserina780 per detectar el pRb fosforilat i un anti-Flag i anti-GFP per corroborar la sobreexpressió. (C) Silenciament de CCNI i CCND1 corroborat amb RT-qPCR. Les columnes representen la mitjana  $\pm$  SEM de tres experiments independents.

A continuació es va avaluar l'estat de fosforilació de pRb en cèl·lules amb el gen CCNI silenciats. En la figura 18B, es pot observar una menor fosforilació de la proteïna pRb principalment quan es silencien CCNI i CCND1, tant en extractes de MDA-MB-231 i A459. Aquestes diferents estratègies indicarien que el complex CDK6-CCNI és actiu i per tant, podria tenir un paper fisiològic per a ser estudiat.

### 1.5. El complex CDK6-CCNI es pot inhibir mitjançant palbociclib *in vitro*

A continuació, es va comprovar mitjançant un assaig cinasa *in vitro* si el complex es podia inhibir a través d'un inhibidor específic de CDK6: el palbociclib, un inhibidor específic de CDK4/6 que s'utilitza a la clínica per tractar tumors ER+ de càncer de mama (Ehab et al., 2016). L'assaig cinasa es va realitzar utilitzant com a substrat la proteïna pRb.



**Figura 19. Palbociclib inhibeix el complex CDK6-CCNI *in vitro*.** (A) Imatge representativa d'un assaig cinasa *in vitro* utilitzant proteïnes recombinants purificades de *E. coli* en presència de concentracions creixents de palbociclib. pRb s'ha utilitzat com a substrat. La fosforilació s'ha detectat amb un anti-ésteriofosfat. (B) El gràfic representa la quantificació dels assaig cinasa *in vitro*. Les columnes representen la mitjana ± SEM d'almenys dos experiments independents. No s'aprecien diferències significatives a l'aplicar el test Mann-Whitney.

La figura 19 mostra una imatge representativa de l'assaig cinasa i la quantificació d'aquests. Tant la imatge com la quantificació mostren que la fosforilació de pRb disminueix d'una manera similar tant pel complex CDK6-CCND1 com el CDK6-CCNI quan aquests es troben en presència de concentracions creixents de palbociclib. Per tant, en aquest experiment l'activitat del complex CDK6-CCNI s'inhibeix de manera

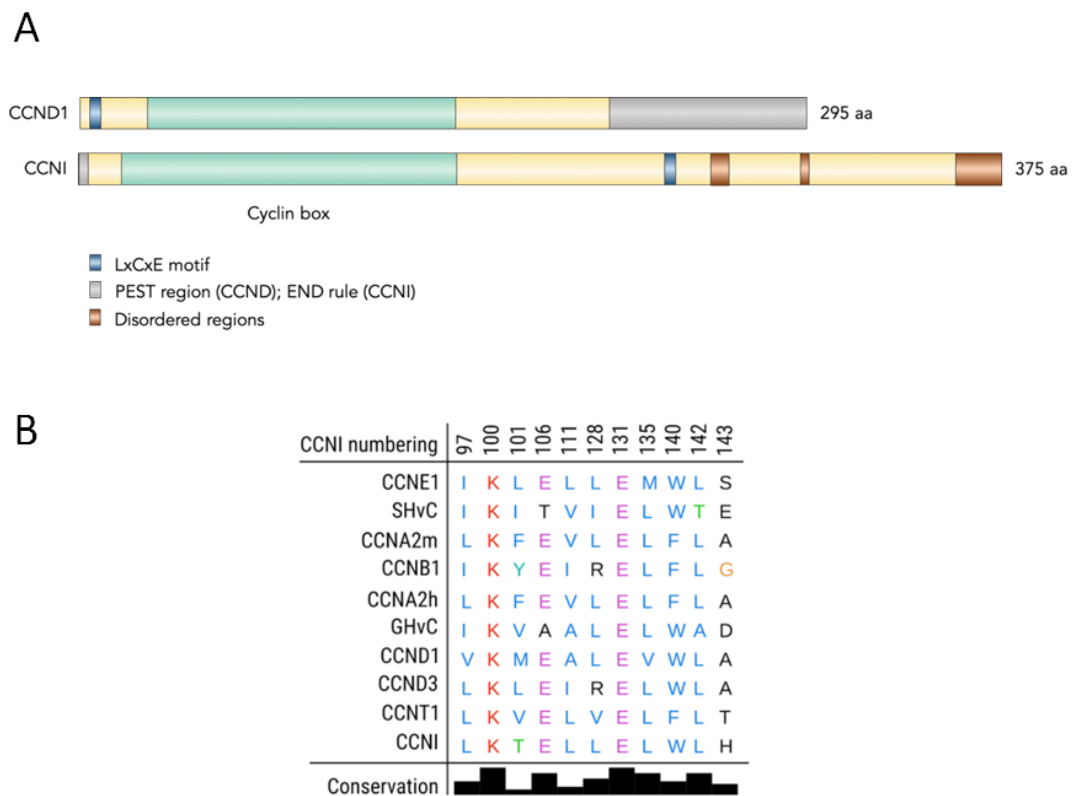


## Resultats

específica per aquest compost, de la mateixa manera que passa amb el complex CDK6-CCND1. Aquest fet, ens indicaria que el complex CDK6-CCNI és pot inhibir amb palbociclib amb la mateixa efectivitat que el complex CDK6-CCND1.

### 1.6. Anàlisi estructural de CCNI

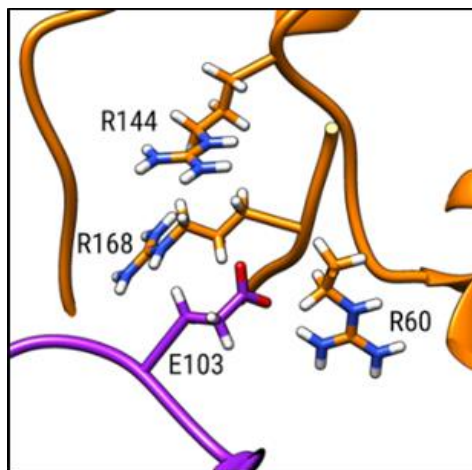
La detecció d'aquest nou complex ens va portar a analitzar l'estructura de CCNI en comparació amb altres ciclines per predir el model d'interacció entre CCNI-CDK6. Tot i que la caixa ciclina de CCNI comparteix un elevat grau d'homologia amb la de CCND1, la resta de la seqüència es menys similar (figura 20A), dificultant la predicció d'interacció del nou complex.



**Figura 20. Anàlisi estructural de CCNI.** (A) Comparació de les seqüències de CCNI i CCND1. Els diferents motius han sigut detectats amb el recurs ELM (<http://elm.eu.org/>). La predicció de longitud de la caixa ciclina i les regions desordenades de CCNI s'han predit amb el recurs Hammer (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/>) (Potter et al., 2018). Les regions PEST en el cas de CCND1 i END per CCNI s'han detectat amb el software epestfind (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/epestfind>). (B) Comparació de la identitat dels residus a les posicions comunes de tots els complexos CDK-ciclina. els números fan referència a les posicions de les seqüències dipositades a la base de dades UniProt per CCNI (Q14094) i CDK6 (Q00534). SHvC: ciclina viral de *Saimiriine herpesvirus 2*, CCNA2m: *Mus musculus* ciclina A2, CCNA2h: *Homo sapiens* ciclina A2, GHvC: ciclina de Gamma herpesvirus.

A continuació, juntament en col·laboració amb el grup del Dr. Jordi Villà es va explorar la conservació de diverses posicions típiques d'altres complexos CDK-ciclina cristal·litzades i dipositades al PDB. Es van trobar 10 posicions implicades en els complexos CDK-ciclina, de les quals 11 i 9 estaven conservades en ciclins i cinases, respectivament. Entre elles, la K100 i E131 estan conservades en totes les ciclins (figura 20B) i també en CCNI, suggerint que el mecanisme d'interacció amb CDK6 és el mateix que el de la resta de ciclins i suggerint, de retruc, la plausibilitat teòrica d'aquesta interacció entre CDK6 i CCNI.

Les anàlisis realitzades van suggerir, a més, que hi ha altres residus importants com E103 que permetria a CCNI interaccionar específicament amb un grup de 3 residus carregats positivament (R60, R144 i R168) de CDK6 (figura 21). A falta de ser validada experimentalment, aquesta interacció seria una característica pròpia de CCNI que caldria tenir en compte si es volguessin realitzar estratègies farmacològiques d'inhibició específiques per aquest complex CCNI/CDK6.



**Figura 21. Representació esquemàtica estructural de la interacció entre CCNI i CDK6.** El residu E103 de CCNI interacciona amb 3 arginines de CDK6 (R60, R144 i R168). CCNI es mostra en lila i CDK6 en taronja.

## CAPÍTOL 2. PAPER DE LA CICLINA ATÍPICA CCNI EN DIFERENTS LÍNIES CEL·LULARS TUMORALS

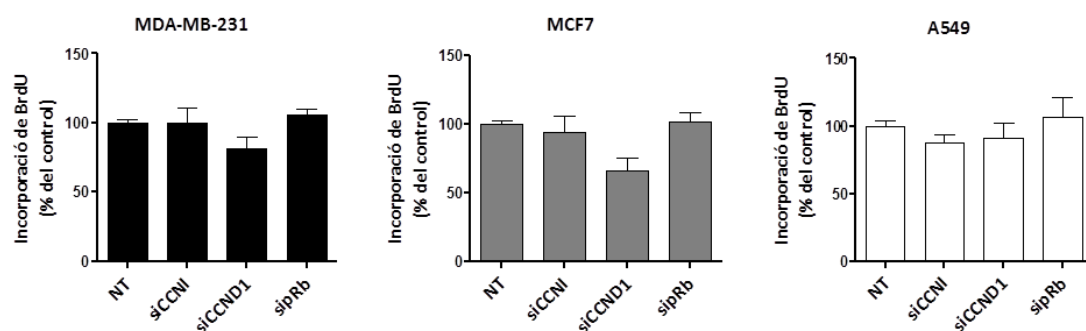
Tot i que CCNI ja ha estat descrita prèviament (Cybulski et al., 2015; Nakamura et al., 1995), fins al moment quasi no s'havia aportat informació de quin paper fisiològic i/o patològic podia tenir aquesta ciclina. En treballs previs del nostre grup es va veure que CCNI està sobreexpressada de manera diferencial tant en línies cel·lulars d'adenocarcinoma de pulmó com en mostres tumorals de pacients amb càncer de pulmó en comparació amb el teixit adjacent normal (Gasa et al., 2017). Amb aquests antecedents es va estudiar el possible paper de CCNI en la sobreactivació de CDK6 en diferents línies cel·lulars tumorals.

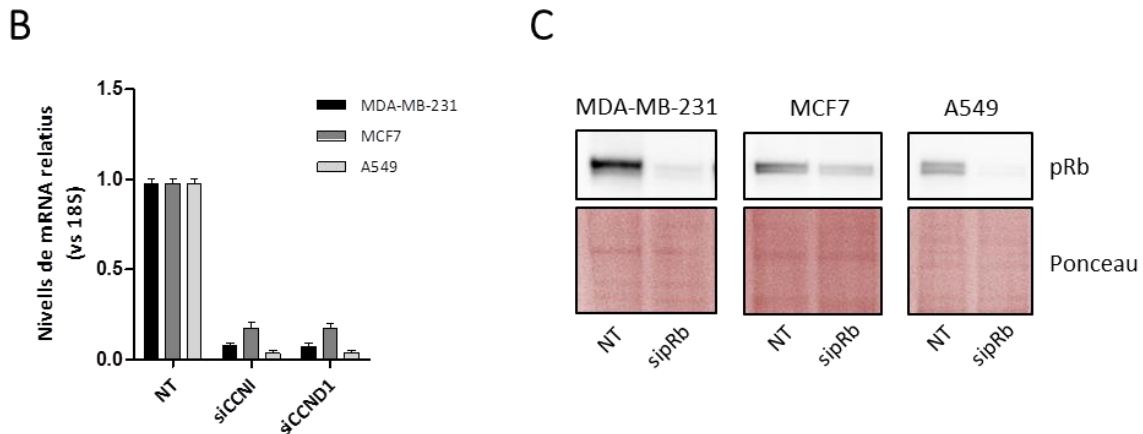
Una de les propietats més conegudes d'una sobre activació de CDK6 és la proliferació augmentada que mostren les seves cèl·lules, per exemple quan tenen un excés de CCND. Per aquest fet, l'aproximació principal seguida en aquest treball ha sigut determinar el paper de la sobreexpressió de CCNI en la proliferació cel·lular mitjançant el seguiment de diferents paràmetres.

### 2.1. La disminució dels nivells de CCNI no afecta la proliferació cel·lular

Primerament, es va investigar l'efecte en la proliferació de la CCNI endògena en diferents línies cel·lulars cancerígenes. Per això, es van transfectar diferents línies amb un siRNA de CCNI i es va analitzar la proliferació mitjançant la incorporació de BrdU.

A





**Figura 22. El silenciament de CCNI, CCND1 o pRb no produeix cap efecte en la proliferació.** (A) Les cèl·lules es van sembrar en plaques de 96 pous i es van transfectar el dia següent amb una seqüència control *non-targeting* (NT) o amb un siRNAs de CCNI, CCND1 o pRb. La incorporació de BrdU es va monitoritzar després de 72h. Les columnes representen la mitjana  $\pm$  SEM detresexperiments independents.No s'observen diferències significatives al aplicar el test Mann-Whitney. (B) Silenciament de CCNI i CCND1 monitoritzat amb RT-qPCR. Les columnes representen la mitjana  $\pm$  SEM d'almenys dos experiments independents.(C) Imatge representativa de WB per corroborar el silenciament de pRb.

En la figura 22A s'observa que la disminució dels nivells de CCNI no mostra diferències en la proliferació cel·lular respecte el control en cap de les tres línies cel·lulars utilitzades. Tenint en compte la via de senyalització CDK6-CCND-pRb en la fase  $G_1$  del cicle cel·lular també es va comprovar si la disminució d'elements clau en el control de la fase  $G_1$  com CCND1 o pRb provocaven diferències en la proliferació. Els resultats, també a la figura 22A, mostren de nou que tampoc es van obtenir diferències respecte el control en cap de les línies cel·lulars. El silenciament de CCNI i CCND1 és va comprovar mitjançant qPCR (figura 22B) i el silenciament de pRb es va analitzar mitjançant *Western Blot* (figura 22C). Aquests resultats suggereixen que les múltiples capes de control presents en la fase  $G_1$  produeixen una redundància en el cicle cel·lular, fent que sigui poc probable que la caiguda de només un regulador afecti significativament la proliferació cel·lular.

## 2.2. La sobreexpressió de CCNI mostra diferents efectes en la proliferació en varies línies cel·lulars

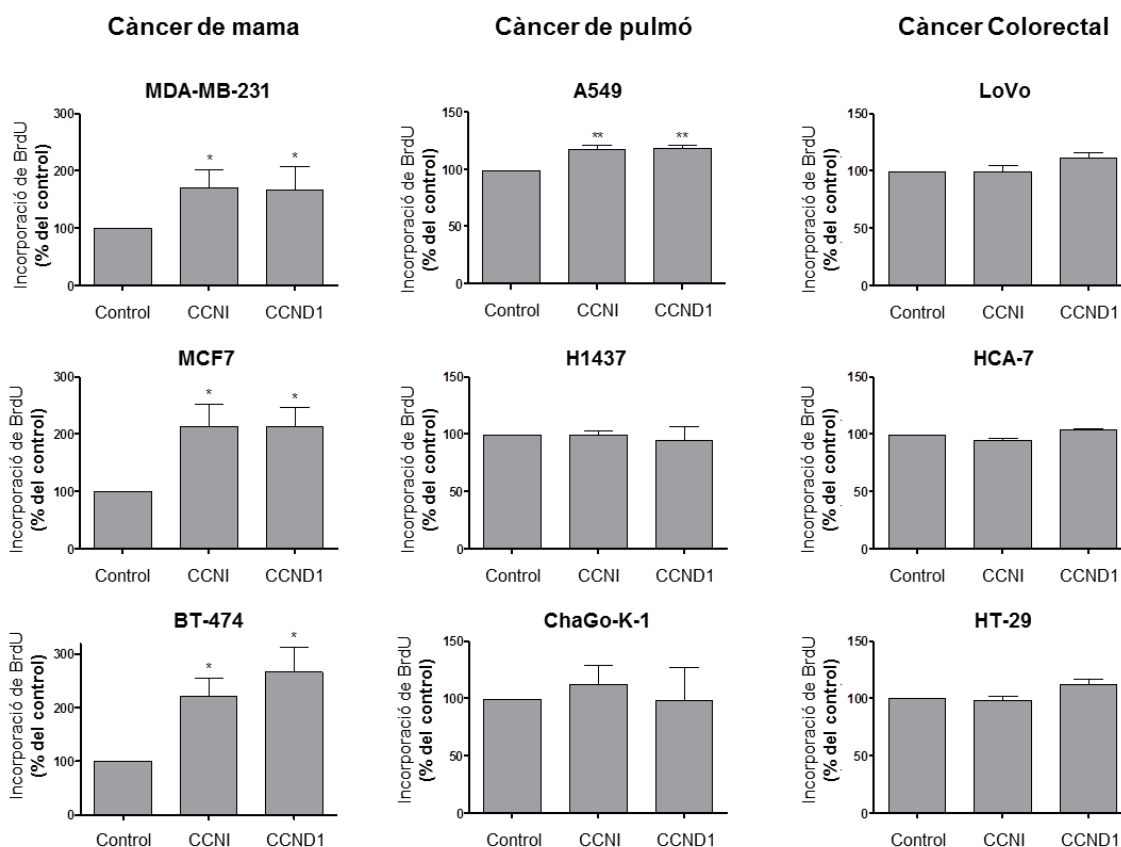
Tenint en compte l'escenari de redundància es va decidir canviar d'estratègia i estudiar el paper de CCNI sobreexpressada mimetitzant així un grup de càncers humans que presenten un increment en la regulació de CCNI. Així, es va fer un cribratge en varies línies cel·lulars dels tres tipus de càncers més freqüents (càncer de mama, pulmó i colorectal).

## Resultats

Es va sobreexpressar CCNI i CCND1 en les cèl·lules transduint-les amb un vector lentiviral i la seva proliferació es va analitzar per assaig de BrdU colorimètric comparant-les amb cèl·lules a les que s'havia transduït un vector buit.

Es pot observar a la figura 23 que de les nou línies cel·lulars, quatre mostren una major proliferació cel·lular quan es sobreexpressa CCNI (les 3 línies de càncer de mama i A549). Per tant, sembla ser que aquest efecte fenotípic no és un fet aïllat d'un tipus cel·lular específic, ja que el podem observar en més d'una línia cel·lular de teixits diferents, tot i que en cap de les tres línies cel·lulars de càncer de còlon s'obtenen diferències. Es va poder observar bibliogràficament que entre els marcadors genètics més evidents (p53, p21, p27, etc) no n'hi ha cap que correlacioni plenament amb aquest diferent efecte en la proliferació cel·lular. Però, en canvi, és molt interessant assenyalar que quan analitzem l'efecte de la proliferació de la sobreexpressió de CCND1, curiosament, s'observa el mateix efecte i en les mateixes línies que sobreexpressen CCNI.

Aquest resultat suggereix que l'efecte produït per CCNI, similar al de CCND1 segueix un mecanisme d'acció comú.



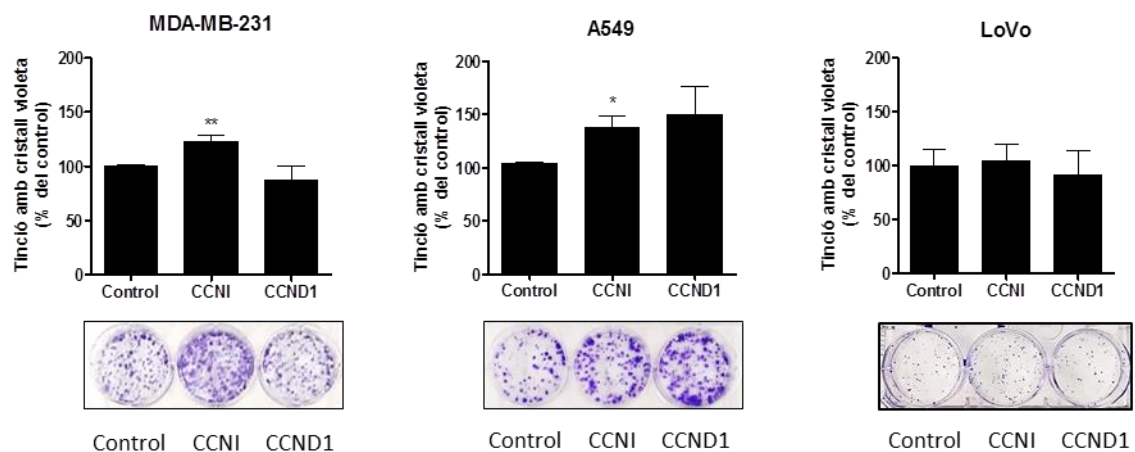
**Figura 23. Sobreexpressió de CCNI en diferents cèl·lules cancerígenes.** Les cèl·lules van ser infectades amb el vector lentiviral buit (control) o amb les construccions indicades. La proliferació cel·lular va ser avaluada als 5 dies de la transducció dels virus després de la incorporació del BrdU. Les columnes

representen la mitja  $\pm$  SEM de tres experiments independents realitzats per triplicat. \* $p < 0,05$  i \*\* $p < 0,01$  vs control, test Mann-Whitney.

### 2.3. L'efecte de la proliferació de CCNI es manté a mig termini

Els experiments d'incorporació de BrdU, són molt còmodes d'implementar al laboratori, però solament mostren els efectes de proliferació a curt termini. Per poder valorar si els efectes de la sobreexpressió es mantenen durant un període de temps més llarg es va realitzar la tècnica de formació de colònies. A fi de simplificar el disseny experimental es va escollir una sola línia cel·lular representativa de cada teixit.

Al sobreexpressar CCNI és pot observar un 22% i un 37% més de proliferació respecte el control en MDA-MB-231 i A549, respectivament (figura 24). Precisament en aquestes línies, ja es veia una major proliferació amb CCNI a les 96h (figura 23) i que ara es segueix observant al cap de 15 dies. Per contra, en el cas de la línia cel·lular LoVo, altre cop seguim sense observar un fenotip de proliferació al sobreexpressar CCNI. Sorprenentment, si ens fixem en els resultats de CCND1 aquests no tenen efecte significatiu en cap de les 3 línies en comparació amb el control. Així doncs sembla que CCNI, en aquestes condicions, té un efecte en la proliferació més potent a mig termini.



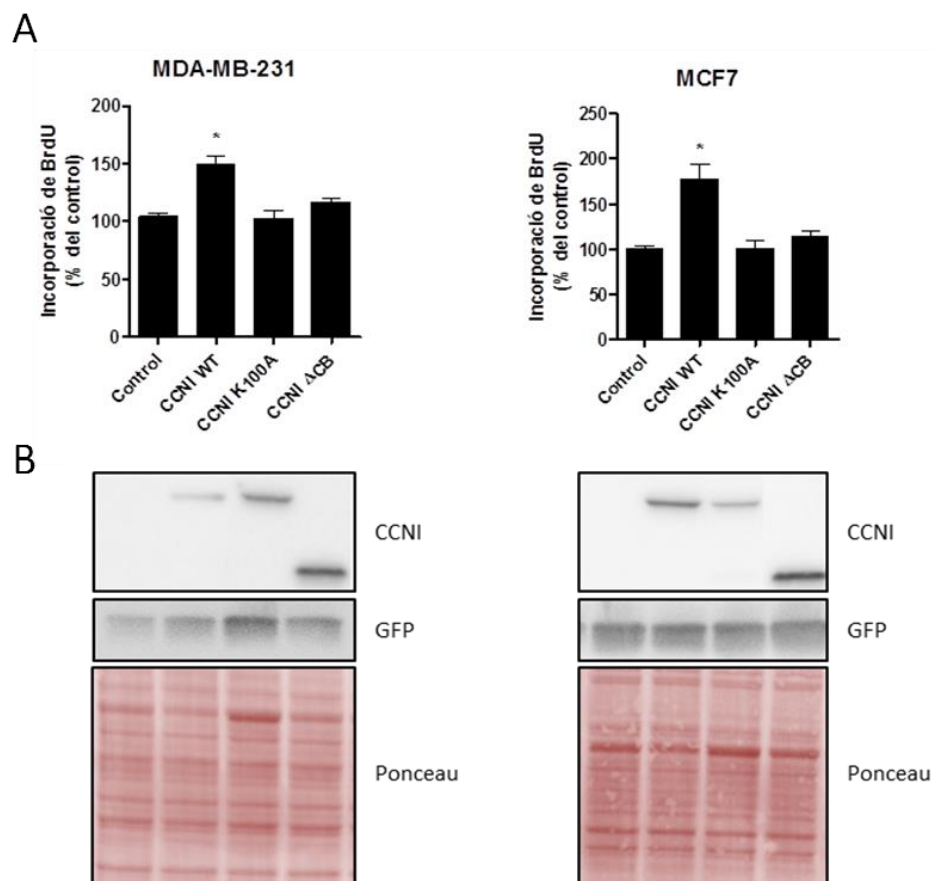
**Figura 24. La proliferació per CCNI és manté a llarg termini.** Les línies cel·lulars es van infectar amb el vector lentiviral buit (control) o amb les construccions indicades. La tinció de colònies es va realitzar al cap de 15 dies. La imatge representa un experiment representatiu de cada línia cel·lular. Les columnes representen la mitja  $\pm$  SEM de quatre experiments independents realitzats per duplicat. \* $p < 0,05$  i \*\* $p < 0,01$  vs control, test Mann-Whitney.

### 2.4. La proliferació per CCNI és CDK dependent

Seguint la investigació de l'efecte proliferatiu de CCNI es va decidir estudiar si aquest fenotip es dependent de CDK mitjançant la construcció d'una CCNI que no interaccioni amb CDKs. A causa de la falta de dades cristal·logràfiques d'aquesta ciclina

## Resultats

atípica, es va seguir l'estratègia del treball del grup de Sakamoto (Shehata et al., 2015) en el qual troben que hi ha una lisina conservada en moltes ciclins que podria estar implicada en la interacció amb la CDK. Es va comprovar que aquesta lisina també havia sigut predita com a molt important per la interacció entre CCNI i CDK6 en el nostre model (figura 20B) i, per tant, es va mutar la lisina 100 per una alanina (K100A) i es va clonar en el plasmidi pWPI per poder produir virus i infectar les cèl·lules. Per comprovar l'efecte de la proliferació cel·lular es va dur a terme un assaig BrdU colorimètric en les línies cel·lulars en les quals la sobreexpressió de CCNI produeix un efecte robust de la proliferació.



**Figura 25. Proliferació per CCNI mutada en diferents línies cel·lulars.** (A) Representació esquemàtica de la nova regió mutada de la seqüència de CCNI humana. (B) Les línies cel·lulars MDA-MB-231 i MCF7 van ser transduïdes amb el vector lentiviral buit (control) o les construccions indicades. La proliferació va ser analitzada per la incorporació de BrdU als 5 dies de la transducció dels virus. La infecció va ser comprovada per *Western Blot* (imatge representativa). Les columnes representen la mitja  $\pm$  SEM de quatre experiments independents realitzats per triplicat. \* $p < 0,05$  vs control, test Mann-Whitney.

Podem veure a la figura 25 que tant en MDA-MB-231 com MCF7, la sobreexpressió de CCNI produeix una major proliferació tal com s'ha vist a la figura 23, a diferència de la construcció de CCNI K100A que no produeix un increment en la proliferació en comparació a CCNI WT en cap de les línies cel·lulars.

Per corroborar aquest fenotip es va dissenyar una CCNI mancada de la caixa ciclina (CCNI  $\Delta$ CB). Així, a la figura 25 podem observar que aquesta última construcció tampoc es capaç d'incrementar la proliferació.

En ambos casos, les dues isoformes deficientes en la unió a CDK no poden augmentar la proliferació cel·lular, suggerint que CCNI estimula la proliferació de les línies cel·lulars tumorals a través de la seva interacció amb CDK.

## 2.5. La proliferació de CCNI és dependent de CDK6

Respecte el punt anterior, sembla que CCNI té un paper en la proliferació dependent de CDK. També s'ha vist al primer capítol que CCNI interacciona amb CDK6, per tant podria ser que aquest paper en la proliferació per part de CCNI es dugui a terme per la seva interacció específicament amb CDK6.

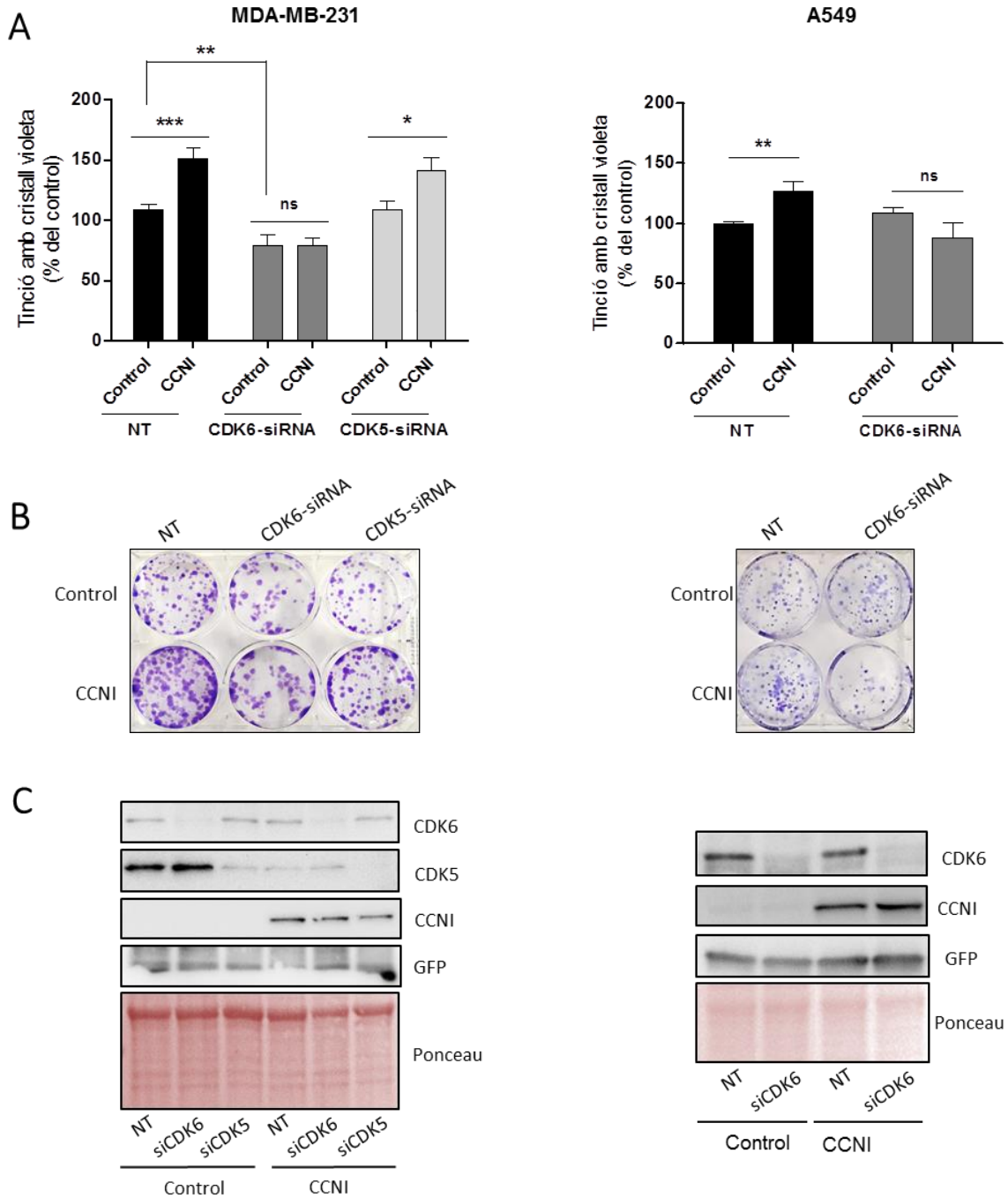
Per demostrar aquesta hipòtesi es va valorar la capacitat de formació de colònies de línies cel·lulars que sobreexpressaven CCNI i que alhora se'ls silenciava CDK6. En el cas de la línia cel·lular MDA-MB-231 es va monitoritzar també el silenciament de CDK5 (CDK que com ja s'ha comentat també interacciona amb CCNI) per determinar si la proliferació deguda a l'increment de CCNI és dependent d'aquesta CDK.

En la línia cel·lular MDA-MB-231, el silenciament de CDK6, a diferència del de CDK5, produeix un menor creixement tal com està descrit (Romero-Pozuelo, Figlia, Kaya, Martin-Villalba, & Teleman, 2020) (figura 26A); i la sobreexpressió de CCNI produeix un increment de proliferació, tal com s'havia observat anteriorment (figura 23). En canvi, aquest fenotip de proliferació causat per la sobreexpressió de CCNI desapareix al silenciar CDK6, i aquesta dependència es veu tant en la línia de càncer de mama com la de pulmó. A més, en el cas de MDA-MB-231 es pot observar que la formació de colònies a través de CCNI no depèn de CDK5. A la figura 26B es pot observar una imatge representativa de la formació de colònies per cada línia cel·lular. La infecció i el silenciament es van monitoritzar per *western blot* (figura 26C).

Aquests resultats indicarien que CCNI necessita la presència de CDK6 (i només de CDK6 en el cas de la línia cel·lular MDA-MB-231) per dur a terme l'increment de proliferació i, per tant potser aquest complex té un paper en la proliferació *in vivo*.



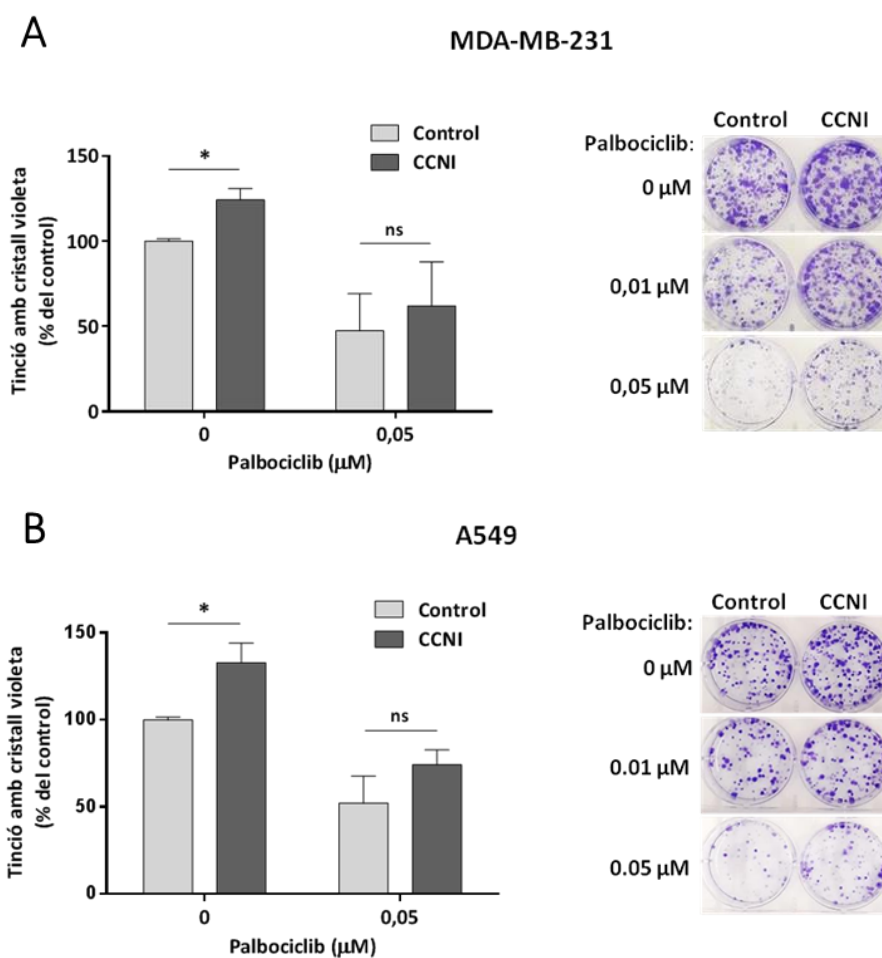
## Resultats



**Figura 26. La formació de colònies per CCNI depèn de CDK6.** (A) Les línies cel·lulars tumorals van ser infectades amb el vector lentiviral buit (control) o el vector lentiviral que expressa CCNI. A les 48h de la infecció les cèl·lules es van transfectar amb el siRNA control, el siRNA per CDK6 a 10nM o el siRNA per CDK5 a 25 nM. La formació de colònies es va quantificar al cap de 15 dies. (B) Imatge representativa de cada línia cel·lular de la formació de colònies. (C) Imatge representativa després de 96h de silenciament del *Western Blot* per detectar els nivells de les proteïnes. Les columnes representen la mitja  $\pm$  SEM de tres experiments independents realitzats per duplicat. Les imatges representen imatges representatives de la formació de colònies i del *Western Blot*, respectivament. \* $p < 0,05$  i \*\* $p < 0,01$  vs el control indicat, test Mann-Whitney.

## 2.6. La proliferació induïda per CDK6-CCNI es pot inhibir mitjançant palbociclib

Tal com ja s'ha mostrat en la figura 19, el complex CDK6-CCNI s'inhibeix per palbociclib *in vitro*. Tenint en compte que el fenotip de proliferació per part de CCNI és dependent de CDK6 es va voler comprovar si és necessari que CDK6 sigui activa. Amb aquesta finalitat, es va sobreexpressar CCNI en les línies cel·lulars MDA-MB-231 i A549 i es va deixar que formessin colònies en presència de diferents concentracions de palbociclib.



**Figura 27. El palbociclib frena la proliferació cel·lular induïda per CCNI.** (A-B) Les línies cel·lulars van ser infectades amb el vector buit (control) o la construcció que expressa CCNI. Després les cèl·lules foren tractades amb les concentracions indicades de palbociclib. La formació de colònies es va examinar a les dues setmanes. Les columnes representen la mitja  $\pm$  SEM de tres experiments independents realitzats per duplicat. Les imatges mostren una imatge representativa de la formació de colònies. \* $p < 0,05$  vs el control indicat, test Mann-Whitney.

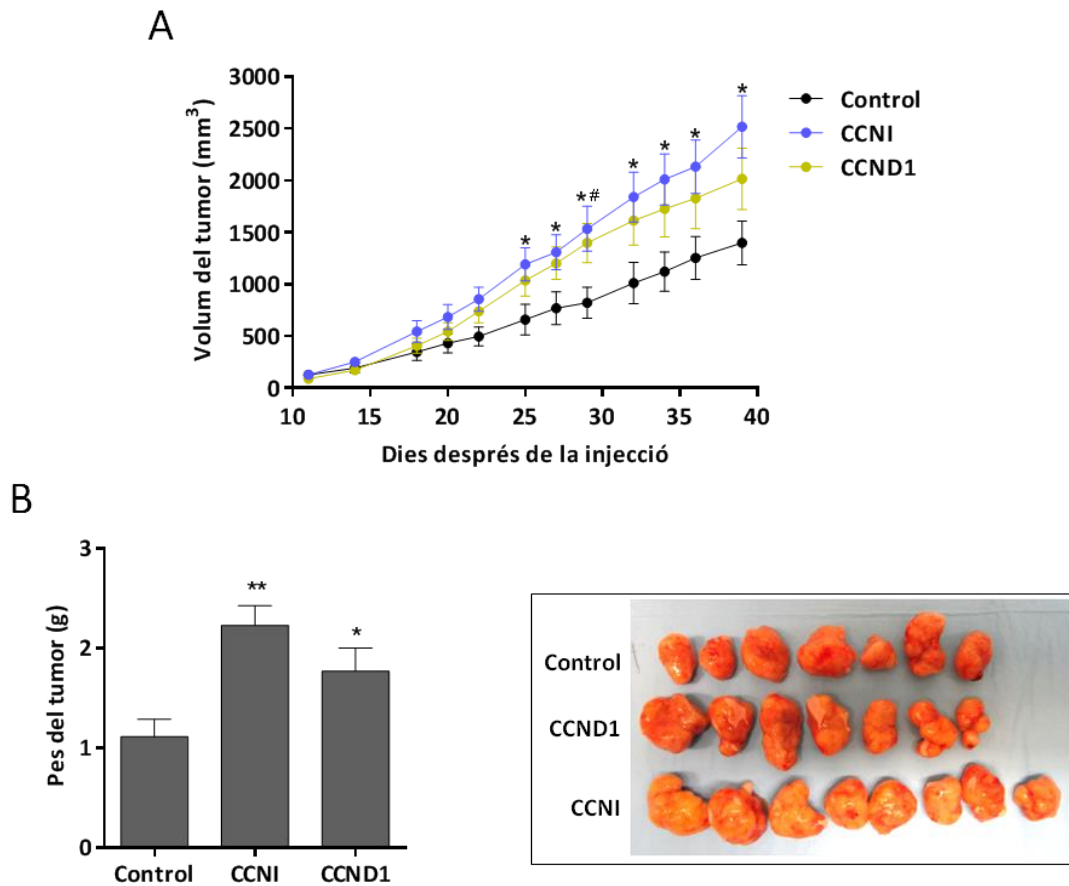
## Resultats

Tal com ja s'havia indicat en les figura 23 i 24, la sobreexpressió de CCNI produeix una major proliferació en ambdues línies cel·lulars, la qual a causa del tractament amb palbociclib cau més del 50% tant en MDA-MB-231 com A549 (figura 27A i B, respectivament). Tenint en compte l'especificitat del palbociclib per la CDK6 (Ehab et al., 2016) aquest resultat, de nou és coherent en que l'efecte en la proliferació de la CCNI sobreexpressada vagi a través de CDK6.

### 2.7. L'increment de CCNI intracel·lular està associat amb un augment del creixement tumoral *in vivo*

Un cop obtinguts els resultats *in vitro* i en les diferents línies cel·lulars tumorals es van investigar els efectes de CCNI *in vivo*. Per comprovar-ho es va escollir el ratolí com a model animal, ja que és un dels més usats a l'hora de poder reproduir i estudiar malalties de manera més concreta, com permetre l'ajuda en millorar tractaments existents o fins i tot, desenvolupar noves teràpies experimentals. En aquest cas per realitzar l'implant de les cèl·lules es va seguir una metodologia ortotòpica, és a dir que les cèl·lules d'interès són injectades al mateix teixit d'origen del ratolí. Aquests implants ortotòpics permeten reproduir d'una manera més similar les característiques histològiques i moleculars del tumor humà, així com també el patró de disseminació del tumor. Aquesta metodologia es va realitzar en col·laboració amb el grup del Dr. Alberto Villanueva.

El model cel·lular escollit va ser MDA-MB-231, model triple negatiu de càncer de mama que es caracteritza per un baix pronòstic en comparació amb altres tipus de càncer de mama. Així, es van injectar cèl·lules MDA-MB-231 infectades amb el vector buit (control) o amb la construcció que sobreexpressa CCND1 o CCNI al ratolins de manera ortotòpica a la glàndula mamària. A la figura 28A es pot observar que els ratolins als quals se'ls va injectar les cèl·lules MDA-MB-231 que sobreexpressen CCNI, formen tumors que creixen més ràpid que els formats per les cèl·lules control. S'obtenen els mateixos resultats per les cèl·lules que sobreexpressen CCND1. El dia 39, els ratolins van ser sacrificats i es van extreure i pesar els tumors. Així es poden confirmar les mesures realitzades durant el procés. A la figura 28B es pot comprovar, que els tumors formats per cèl·lules MDA-MB-231 infectades amb CCNI i CCND1 són més grans i pesen més que els tumors generats per les cèl·lules control.

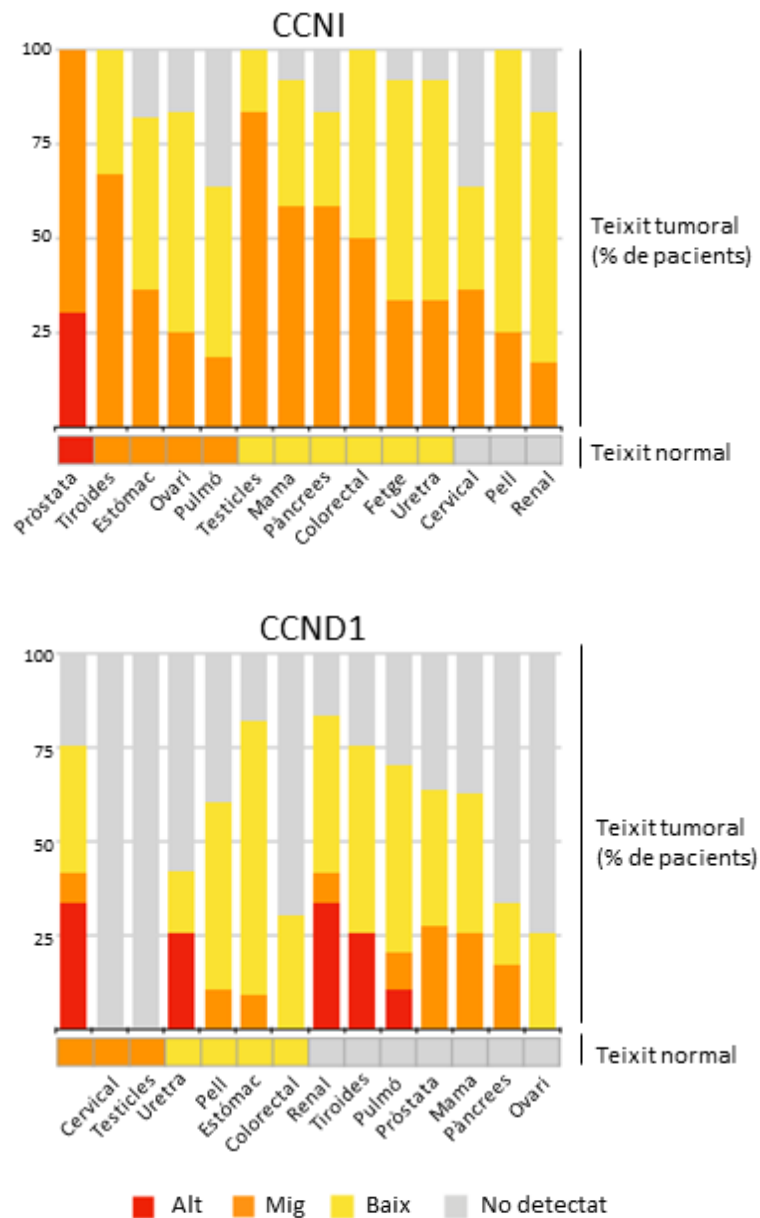


**Figura 28. La sobreexpressió de CCNI augmenta el creixement tumoral *in vivo*.** (A) Mesura del volum del tumor als dies indicats després de que les cèl·lules MDA-MB-231-vector buit (control) o la construcció de la ciclina indicada fossin injectades als ratolins (n=7). (B) Pes dels tumors extrets dels ratolins a dia 39. La imatge mostra una imatge representativa dels tumors extrets tant de cèl·lules MDA-MB-231 control o la ciclina indicada. \*p < 0,05 CCNI vs cotrol, #p < 0,05 CCND1 vs control i \*p < 0,05, \*\*p < 0,01 vs control, test Mann-Whitney.

## 2.8. Expressió de proteïna de CCNI i CCND1 en el càncer

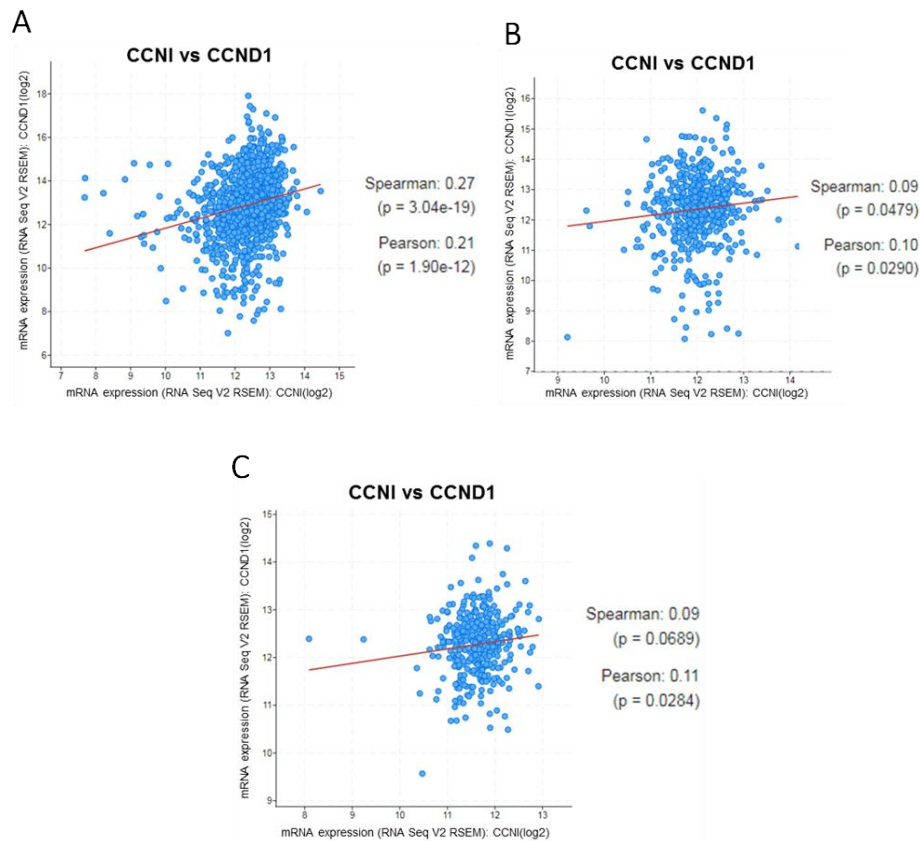
Degut a l'efecte proliferatiu de la sobreexpressió de CCNI en línies cel·lulars i *in vivo* es va investigar si l'expressió proteica de CCNI està sobreexpressada en diferents tipus de càncers humans a través del *Human Protein Atlas* (Uhlén et al., 2015). A la figura 29 es pot observar que CCNI s'expressa en uns nivells mitjans/alts en un percentatge significatiu de pacients amb càncer de diferents tipus histològics. També es va analitzar l'expressió proteica de CCND1 per comparar-la amb CCNI. A diferència d'aquesta, l'expressió mitja/alta de CCND1 només es troba en un número limitat de pacients i tipus de càncers concrets.

## Resultats



**Figura 29. Percentatge dels nivells de CCNI o CCND1 en pacients amb càncer.** Representació del nivell d'expressió baix, mig o alt de les proteïnes CCNI i CCND1. Es mostra també l'expressió de proteïna en teixit normal. Les dades han sigut obtingudes de la base de dades *Human Protein Atlas* (www.proteinatlas.org) consultada el Març del 2020.

Vist que CCNI s'expressa en nivells mitjos/alts en un nombre significatiu de tumors es va realitzar un anàlisi bioinformàtic d'expressió de mRNA al cBioPortal (<https://www.cbioportal.org/>) per saber si la sobreexpressió de CCNI i CCND1 són mútuament excloents. A la figura 30 es pot observar que s'obté una correlació positiva entre l'expressió de CCNI i CCND1 en adenocarcinomes de pulmó i colon i, amb una significança especialment rellevant en carcinomes invasius de càncer de mama. Aquesta evidència suggereix que les dues ciclines no són del tot redundants i la seva coexistència pot aportar un benefici addicional a les cèl·lules tumorals.



**Figura 30.** L'expressió de CCNI correlaciona positivament amb l'expressió de CCND1 en pacients de càncer de mama. Dades obtingudes del cBioPortal ([cbioportal.org](http://cbioportal.org)) el 8 de març del 2021. (A) Carcinoma invasiu de càncer de mama (TCGA, *firehoselegacy*  $n = 1100$ ). (B) Adenocarcinoma de càncer de pulmó (TCGA, *firehoselegacy*,  $n = 517$ ). (C) Adenocarcinoma colorectal (TCGA, *firehoselegacy*,  $n = 382$ ).

## 2.9. Els efectes de CCNI són dependents de teixit, del context genètic i ambiental

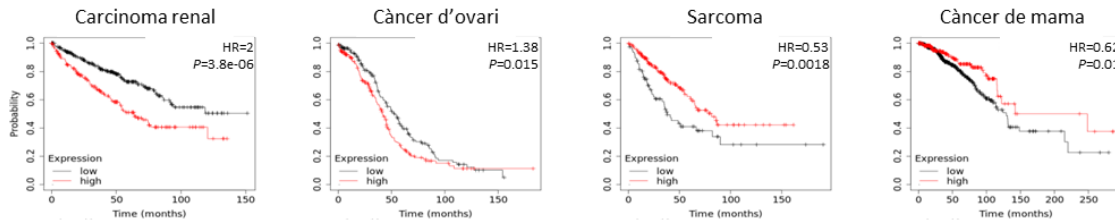
A continuació, es va voler analitzar si els nivells d'expressió de CCNI poden suggerir un pronòstic en el càncer, tal i com passa amb altres ciclines. Per això es va analitzar la supervivència general de pacients amb càncer estratificats en nivells d'expressió de CCNI utilitzant les dades de *KM Plotter* (<http://kmplot.com/>) (Gyorffy et al., 2013).

Depenent del tipus histològic, una expressió elevada de CCNI pot estar associada tan a un bon pronòstic clínic (càncer de mama o sarcoma) com un mal pronòstic (càncer d'ovari o carcinoma renal) (figura 31A). Si analitzem un mateix tipus histològic, els efectes de CCNI depenen del context genètic, remarcant l'impacte oposat de CCNI en la supervivència de pacients de càncer gàstric o d'ovari amb mutacions a ERBB2 o p53, respectivament (figura 31B). També podem observar un efecte de l'ambient en el pronòstic de sobreexpressió de CCNI en el mateix tipus de tumor depèn del consum d'alcohol o tabac (figura 31C). Per tant, aquests resultats en conjunt indiquen que els

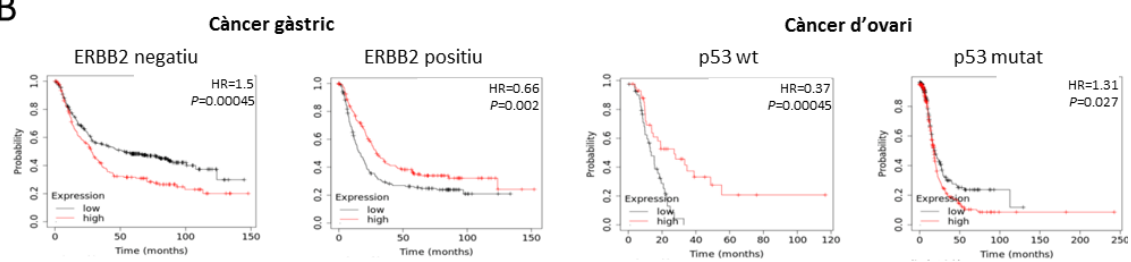
## Resultats

efectes moleculars de CCNI van lligats a un context tissular, genètic i de condicions ambientals. Aquest fet és similar al produït per altres ciclines, com CCND1 la qual el seu valor de pronòstic en càncer també està limitat a un conjunt de tumors en concret (figura 31D).

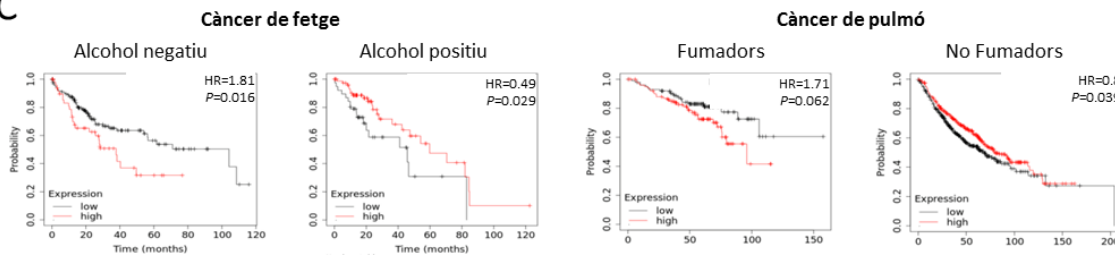
A



B



C



D

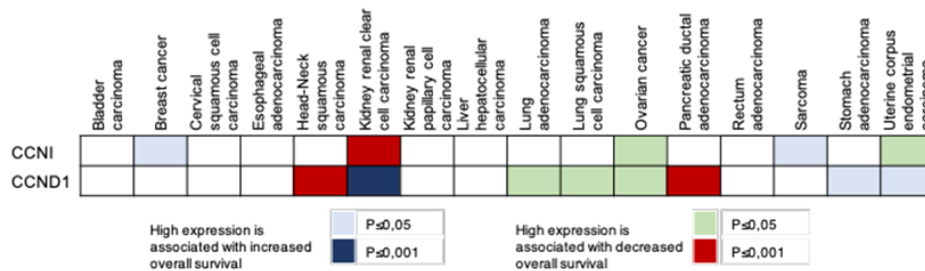


Figura 31. El pronòstic de CCNI depèn del context del càncer. (A-C) Supervivència total de pacients amb càncer respecte l'expressió alta (vermell) i baixa (negre) de CCNI representada utilitzant el *software KM plotter* (<http://kmplot.com/>). (A) El pronòstic de CCNI depèn del tipus de tumor. Es mostren els 4 tipus de tumors amb p-valors < 0,05 de la base de dades *Pan-Cancer* (RNAseq). (B) El pronòstic de CCNI depèn del context mutacional. CCNI mostra efectes oposats segons el context genòmic (ERBB2 al càncer gàstric i p53 en càncer d'ovari) segons la base de dades *Gene Chip*. (C) El pronòstic de CCNI depèn de l'història clínica. CCNI juga efectes oposats en funció del consum d'alcohol en pacients amb càncer de fetge o consum de tabac en pacients amb càncer de pulmó segons la base de dades *Gene Chip*. (D) Supervivència total dels pacients inclosos a la base de dades *Pan-Cancer* (RNAseq). La imatge s'ha creat utilitzant el

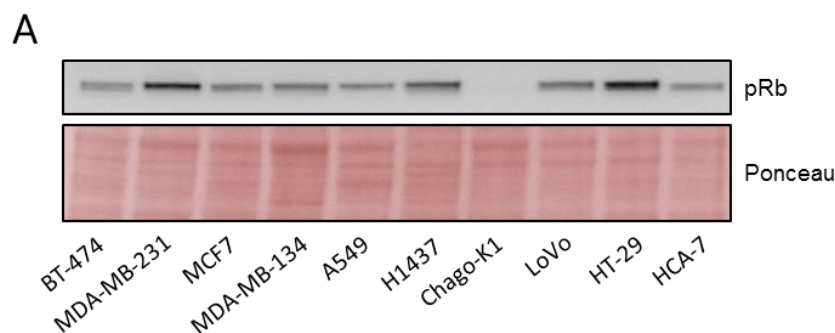
software *KM plotter*. Els colors indiquen associacions significatives entre millors o pitjors pronòstics i la significança estadística indicat a la figura. Les dades han sigut obtingudes el 6 de maig del 2020.

## 2.10. Incrementar els nivells de CCNI en cèl·lules sense pRb no afecta la proliferació

Les cèl·lules tumorals que mantenen un pRb funcional requereixen l'acció de ciclina D1 a la fase G<sub>1</sub> del cicle cel·lular, per contra la funció de CCND1 és dispensable en cèl·lules pRb nul·les, independentment de l'activitat de CDK4/6 (Lukas, Bartkova, Rohde, Strauss, & Bartek, 1995). S'ha comprovat que aquestes cèl·lules són resistent a la inhibició del cicle cel·lular per part d'inhibidors del complex CDK4/6-CCND, com p16<sup>INK4</sup> i la sobreexpressió de ciclina D no provoca un increment de proliferació en cèl·lules que els falta pRb (Kozar & Sicinski, 2005).

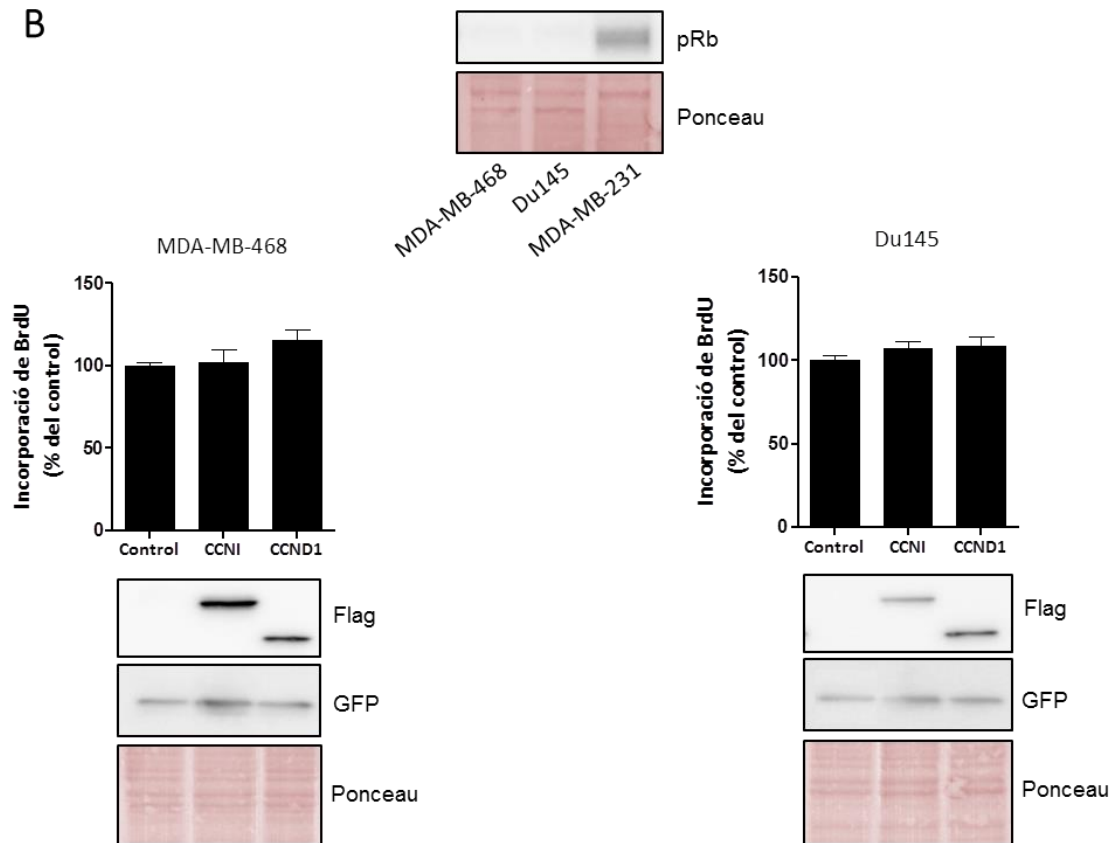
Observant que CCNI dona una proliferació similar a CCND1 es va comprovar aquesta idea en models cel·lulars negatius per pRb. Primerament, es va analitzar l'expressió de pRb en les línies cel·lulars utilitzades en aquest treball (figura 32A); es pot observar que la línia cel·lular ChaGo-K-1 és pRb nul·la. Efectivament, en aquesta línia cel·lular ni la sobreexpressió de CCND1 ni la de CCNI provoquen una major activitat proliferativa (figura 23).

Per confirmar aquesta idea es van utilitzar dos models cel·lulars addicionals mancats de pRb (MDA-MB-468 i Du145). En ambdues línies cel·lulars, tampoc es va observar un increment de la proliferació ni al sobreexpressar CCNI ni CCND1 (figura 32B). Aquest resultat indicarien que CCNI podria exercir el seu efecte proliferatiu a través de pRb.





## Resultats



**Figura 32. Efectes de la sobreexpressió de CCNI en línies cel·lulars tumorals mancades de pRb.**(A) *Western Blot* de l'expressió de pRb en les línies cel·lulars tumorals de la figura 23. (B) Les cèl·lules van ser infectades amb el vector lentiviral buit (control) o amb les construccions indicades. La proliferació cel·lular va ser avaluada als 5 dies de la infecció amb virus mitjançant l'assaig de BrdU. Les columnes representen la mitja  $\pm$  SEM de tres experiments independents realitzats per triplicat. Es mostra l'expressió de pRb (MDA-MB-231 com a control positiu) i el control d'infecció de les cèl·lules.

### 2.11. La senyal de CCNI va mediada a través del complex E2F

Els resultats fins ara obtinguts indiquen que CCNI augmenta la proliferació de manera CDK6 depenent. Al capítol 1 s'ha demostrat que el complex CDK6-CCNI fosforila pRb i al punt 2.10 s'ha demostrat que en línies cel·lulars pRb negatives, la sobreexpressió de CCNI no produeix un augment de la proliferació. Fins ara, se sap que CDK6 exerceix el seu efecte a  $G_1$  a través de l'eix pRb-E2F. Per tant, tenint en compte tots aquests indicatius podríem pensar que CCNI porta a terme la seva senyalització a través dels factors de transcripció E2F.

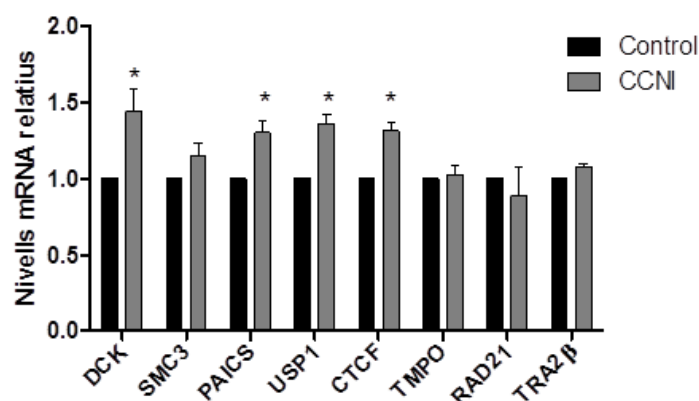
Per aportar més informació sobre la senyal mediada per CCNI es van extreure les dades del portal Depmap (<https://depmap.org/portal/>, DepMap 20Q2 Public) (Ghandi et al., 2019) que conté l'expressió gènica de 1.304 línies cel·lulars de diferents tipus histològics i es va investigar quins gens co-expressent amb CCNI. A continuació es va generar una llista de gens ordenats segons la correlació de la seva expressió amb la de CCNI de totes les línies cel·lulars. Els primers 1.000 gens de la llista es van seleccionar per un Anàlisi

d'Enriquiment Genètic a través del portal GSEA i la col·lecció del conjunt de gens característics de la Base de dades de Firmes Moleculars (MSigDB) (Liberzon et al., 2015). A la taula 7 es pot observar que les primeres posicions de la llista corresponent a 34 gens regulats pels factors de transcripció E2F (p valor =  $10^{-18}$ ; FDR=  $10^{-17}$ ).

Enriched gene set	p-value	FDR q-value
Genes encoding cell cycle related targets of E2F transcription factors	$3.78 \times 10^{-18}$	$9.46 \times 10^{-17}$
Genes involved in the G <sub>2</sub> /M checkpoint	$3.78 \times 10^{-18}$	$9.46 \times 10^{-17}$
Genes important for mitotic spindle assembly	$2.85 \times 10^{-12}$	$4.74 \times 10^{-11}$
Genes regulated by MYC	$3.14 \times 10^{-9}$	$3.93 \times 10^{-8}$
Genes up-regulated during unfolded protein response	$1.51 \times 10^{-6}$	$1.51 \times 10^{-5}$

**Taula 7.** Resultats de l'Anàlisi d'Enriquiment Genètic a través del portal GSEA ([www.gsea-msigdb.org](http://www.gsea-msigdb.org)) i la col·lecció del conjunt de gens característics de la Base de dades de Firmes Moleculars (MSigDB). Només són mostrats els cinc primers grups de gens enriquits. Dades obtingudes el Maig del 2020.

Per validar aquesta correlació es van seleccionar 8 d'aquests gens regulats per E2F i tots considerats gens del cicle cel·lular a través de la Base de dades de la Regulació de Gens Diana (TGRD) (Fischer, Grossmann, Padi, & DeCaprio, 2016) i es va analitzar la seva expressió mitjançant RT-qPCR en MDA-MB-231 sobreexpressant CCNI.

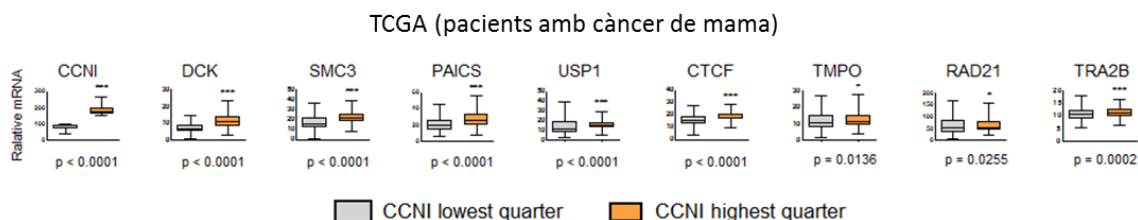


**Figura 33.** La regulació a l'alça de CCNI promou l'expressió de gens regulats per E2F en MDA-MB-231. Les cèl·lules es van transduïr amb el vector buit (control) o la construcció que expressa CCNI i l'expressió dels gens es va analitzar mitjançant RT-qPCR. Els valors obtinguts es van normalitzar amb el gen constitutiu 18S. Les columnes representen la mitja  $\pm$  SEM de quatre experiments independents realitzats per duplicat. \*p < 0,05 vs el control indicat, test Mann-Whitney.

A la figura 33 es pot observar que la sobreexpressió de CCNI incrementa significativament l'expressió dels gens DCK, PAICS, USP1 i CTCF regulats per E2F.

## Resultats

Finalment per comprovar si aquesta correlació també es produeix en pacients de càncer es va analitzar la base de dades de RNA-seq de *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) i, es pot observar que CCNI està significativament lligada a l'expressió dels gens regulats per E2F en pacients de càncer de mama (figura 34).



**Figura 34. La sobreexpressió de CCNI promou l'activació de gens regulats pel complex E2F.** Dades del TCGA per analitzar el perfil de correlació entre CCNI i gens regulats per E2F en pacients amb càncer de mama (n = 269 per cada quartil). Dades obtingudes el juny del 2020.

Si es repeteix l'anàlisi dels primers 1.000 gens que correlacionen la seva expressió amb la de CCNI utilitzant el grup de gens de perturbacions químiques i genètiques del portal GSEA, obtenim en les primeres posicions una llista de gens relacionats amb el complex DREAM que se sap que modula l'expressió dels gens necessaris en la transició G<sub>1</sub>-S a través del control dels promotors E2F (taula 8).

Chemical and Genetic perturbations Enriched gene set	p-value	FDR q-value
Target genes of the DREAM complex	3.28 e <sup>-103</sup>	1.08 e <sup>-99</sup>
Genes of the BRCA1-PCC network with positive correlation with BRCA1	2.54 e <sup>-102</sup>	3.95 e <sup>-99</sup>
Genes down-regulated in ERCC3 mutant fibroblasts after U.V. irradiation	3.59 e <sup>-102</sup>	3.95 e <sup>-99</sup>
Genes down-regulated in doxorubicin induced apoptotic ME-A breast cancer cells	4.94 e <sup>-100</sup>	4.07 e <sup>-97</sup>
Genes up-regulated in CD34 <sup>+</sup> CML (chronic myelogenous leukemia) bone marrow cells	2.3 e <sup>-94</sup>	1.52 e <sup>-91</sup>

**Taula 8. Correlació de l'expressió de CCNI en línies cel·lulars.** Es mostren els resultats del GSEA utilitzant el conjunt de gens de perturbacions genètiques i químiques.

Totes aquestes dades indiquen clarament que els efectes proliferatius de CCNI podrien estar mediat per l'activació de l'eix CDK6-pRb-E2F contribuint en una nova via de regulació del cicle cel·lular.

## DISCUSSIÓ

---



Aquest treball té la finalitat d'aportar coneixement sobre nous complexos CDK-ciclina. Les ciclins tenen un paper rellevant en la divisió cel·lular i en els últims anys les ciclins atípiques s'han posat de manifest com a participants en la progressió i desenvolupament del càncer (Quandt et al., 2020b). Per això, l'objectiu principal d'aquest estudi és la caracterització i estudi de la funció del complex CCNI-CDK6 en la biologia del càncer per poder aportar informació sobre aquest nou complex en aquesta patologia.

El model estàndard de la regulació del cicle cel·lular associa CDK6, i també CDK4 exclusivament a CCND per fosforilar pRb, alliberar els factors de transcripció E2F i permetre així la transició de la fase  $G_1$  a S del cicle cel·lular (Knudsen and Wang, 1997). CDK6 forma part directament de la regulació del cicle cel·lular fet que li aporta un paper prominent en càncer. Això implica que la parella CDK6-CCNI detectada en els estudis previs requereixi una atenció especial.

En aquesta tesi s'ha demostrat que si CCNI es troba sobreexpressada, aquesta actua com una activadora de CDK6. És cert que, tot i múltiples intents, no ha sigut possible aportar una interacció forta entre CDK6 i CCNI i la seva detecció mitjançant la Co-IP ha sigut tot un repte tècnic (figura 25). Això podria ser degut a que la interacció entre CDK6 i CCNI és produïda sota unes condicions cel·lulars determinades que són difícilment reproduïbles en cultius cel·lulars. L'altre explicació podria ser que el complex és fisiològic i real, però extremadament làbil i que no s'han trobat les condicions òptimes de purificació del mateix. Tot i així, cal destacar que s'han aportat varies evidències que donen suport a l'existència cel·lular del complex CCNI-CDK6.

En aquest sentit, s'ha demostrat que el complex reconstituït *in vitro* a partir de proteïnes recombinants fosforila pRb (figura 17) i que, per tant, CCNI actua com una ciclina activadora de CDK6. A més, varies proves genètiques demostren que la proliferació deguda a la sobreexpressió de CCNI és dependent de pRb (figura 32), dependent de CDK (figura 25) i concretament, necessita la presència de CDK6 (figura 26). És cert que el silenciament de CCNI no provoca canvis en la proliferació, però el silenciament d'altres proteïnes tant essencials per la progressió del cicle cel·lular, com ara CCND1 o pRb tampoc són essencials (figura 22) indicant la possible redundància entre diferents participants del cicle i la pertinent complexitat d'anular el fenotip de proliferació excloent tan sols un component.

Es podria argumentar de la dificultat estructural que representa el fet que una ciclina atípica com la CCNI, que només presenta un únic domini *cyclin box*, pugui *de facto* interaccionar amb una CDK de  $G_1$  com CDK6 que només interacciona amb ciclins del tipus D. Però el cert és que CDK6 és també capaç d'interactuar amb la caixa ciclina N-terminal de ciclins víriques (Tatum and Endicott, 2020), suggerint la gran flexibilitat d'interacció entre els complexos CDK-ciclins, o el paper relatiu que representa la

## Discussió

segona *cyclin box* en l'estabilització del complex. De totes maneres, no es pot descartar que la manca d'aquesta caixa ciclina, debiliti en certa mesura la interacció del complex, i que aquest sigui un dels motius pels quals costa tant purificar-lo a partir d'experiments de Co-IP.

En línies cel·lulars, la sobreexpressió de CCNI produeix un increment en la fosforilació de pRb (figura 18A). Des d'un punt de vista estructural, no sembla que hi hagi d'haver cap impediment teòric, ja que CCNI, al igual que CCND i les ciclins virals posseeix el motiu LxCxE necessari per interaccionar amb la fenedura LxCxE de pRb (Dick and Rubin, 2013). Recentment, el grup de Skotheim ha demostrat que pRb té un lloc d'acoblament a la seva hèlix- $\alpha$  del c-terminal que interacciona amb una regió desestructurada de CCND (Topacio et al., 2019), habilitant un patró específic de fosforilació de pRb diferent dels promoguts per altres ciclins. Per tant, seria interessant establir si CCNI interacciona amb l'hèlix- $\alpha$  del c-terminal de pRb tal com fa CCND.

Coherentment amb l'increment de fosforilació de pRb s'ha trobat una correlació positiva entre CCNI i els gens d'expressió diana de E2F (figures 33-34 i taula 7) i un increment de la proliferació cel·lular (figures 23-24), tal com han descrit estudis previs en els que impliquen CCNI en la proliferació cel·lular de HeLa (Nagano et al., 2013) i A549 (Gasa et al., 2017). Tot i que alguns dels fenotips mostrats poden ser mediat per la unió a d'altres CDKs, els resultats d'aquest estudi com l'assaig d'activitat *in vitro* (figura 17) i també els resultats previs del assaig del Y2H (Quandt Herrera, 2017) posen el focus d'atenció en CDK6 com la CDK interactora més rellevant de CCNI. Per una banda, perquè la proliferació cel·lular induïda per CCNI requereix l'expressió de CDK6, però no la de CDK5 (figura 26). Per altra banda també, el paper proliferatiu de la sobreexpressió de CCNI en les diferents 9 línies cel·lulars tumorals és, sorprenentment bastant similar al produït per la sobreexpressió de CCND1 (figura 23) proporcionant una altra evidència que aquestes ciclins comparteixen un mecanisme d'acció comú independentment de quin sigui el fons genètic. Però, el fet que tant CCNI com CCND activin CDK6 no implica necessàriament que els dos complexes tinguin la mateixa funció, ja que les ciclins són les que aporten a la CDK l'especificitat per un substrat (Örd et al., 2019).

El càncer de mama triple negatiu (TNBC, *triple negative breast cancer*) representa del 10 al 15% dels càncers de mama i és el que mostra un pitjor pronòstic. La desregulació de la CCND és un distintiu en el càncer de mama (Asghar, Witkiewicz, Turner, & Knudsen, 2015). Però tot i que en un inici es va pensar que tumors amb amplificacions de CCND o nivells baixos de p16<sup>INK4b</sup> servirien com a biomarcadors, estudis clínics han mostrat que no hi ha correlació entre els nivells d'aquesta ciclina i/o p16<sup>INK4b</sup> i la resposta a inhibidors de CDK4/6 en càncer de mama (Asghar et al., 2015) el que fa sospitar de la presència d'altres elements que jugarien un paper en el desenvolupament de la malaltia. El fet que, els resultats d'aquest treball mostrin que els efectes de CCNI en el

creixement tumoral d'animals models de càncer de mama TNBC siguin similars als promoguts per CCND1 (figura 28), assenyala a la CCNI com un d'aquests possibles elements. Per tant, i degut al mal pronòstic i la falta de tractaments efectius per els pacients de càncer de mama TNBC, CCNI podria representar un marcador de prognòstic innovador i una diana terapèutica per aquest tipus de càncer. Així com l'eix de senyalització CCND1-CDK4/6-p16<sup>INK4</sup> es troba desregulat amb freqüència en el càncer (Kent & Leone, 2019), la desregulació dels mecanismes de la via de senyalització són mútuament excloents i normalment específics de teixit (Asghar et al., 2015). L'anàlisi d'expressió proteica segons el *Human Protein Atlas* suggereix que l'elevada expressió d'ambdues ciclines no es produeix en el mateix tipus de càncer (figura 29), no obstant això l'anàlisi bioinformàtic al cBioPortal (Gao et al., 2013) mostra una correlació positiva entre l'expressió de CCNI i CCND1 amb una significança especialment rellevant en carcinomes invasius de càncer de mama (figura 30). Això suggereix que CCNI i CCND1 no són ciclines alternatives per activar CDK6, sinó que més aviat semblaria que és més probable que ambdues ciclines cooperin per mantenir la hiperactivació de l'eix CDK6-pRb-E2F.

A més a més, l'expressió proteica de CCNI en càncers de diferents tipus histològics se situa en nivells mitjans/alts (figura 29) implicant que el rol oncogènic de CCNI pot estar present en altres càncers. Per exemple, en càncer d'ovari i mama, CCNI està sobreexpressada (Cybulski et al., 2012b) i cal destacar també que el nostre grup ha demostrat que CCNI està sobreexpressada en pacients amb càncer de pulmó i això està associat a un pitjor pronòstic clínic (Gasa et al., 2017). També s'ha descrit que el mRNA de CCNI de la saliva es podria utilitzar per distingir entre els pacients amb càncer de pulmó dels que no presenten la malaltia (Zhang et al., 2012b).

Tot i que els oncògens com les CDKs i les ciclines normalment són mútuament excloents, se sap que CCND1 també porta a terme diverses funcions independents d'unió a CDK i CCNI s'uneix a varies CDKs (resultats previs). Tal com es comentava, aquestes evidències indicarien que ambdues ciclines no són de tot redundants i la seva coexistència aporta un benefici addicional a les cèl·lules tumorals, tot i que són necessaris estudis futurs d'estratificacions de pacients per determinar si hi ha subgrups de tumors que es caracteritzen per una expressió més prominent d'una ciclina enfront l'altra. A més a més, aquestes observacions donen suport a la teoria que CCNI està implicada en el desenvolupament i progressió del càncer convertint-la també en un potencial biomarcador per l'estratificació de pacients amb càncer (figura 31A-C). Si ens fixem en els nivells de CCND1, aquests curiosament correlacionen significativament amb la supervivència dels pacients en un número limitat de tumors (figura 31D). Tenint en compte però, que les ciclines són modificades a nivells post-traduccionals és lògic pensar que la significança del pronòstic, basat en els nivells de mRNA, subestimi el seu impacte clínic.



## Discussió

Cal recordar que una majoria de gens que correlacionen amb CCNI utilitzant l'enriquiment de perturbacions químiques i genètiques del portal GSEA (taula 8) són gens relacionats amb el complex DREAM. El complex DREAM és troba present en la fase quiescent ( $G_0$ ) i contribueix a la repressió dels gens necessaris per entrar de nou al cicle cel·lular, a diferència de pRb que contribueix a la repressió de  $G_1$ . Però un model recent proposaria que DREAM i pRb cooperen per reprimir un conjunt de gens superposats de l'inici del cicle cel·lular (Schade et al., 2019). A més, la sobreexpressió de CCND1 no només inactiva la funció de pRb sinó que també inactiva DREAM (Ortiz et al., 2017). En aquest sentit, seria interessant determinar si la sobreexpressió de CCNI causa una interrupció del complex DREAM i si té algun paper en la desestabilització d'aquest complex en tumors que no sobreexpressen CCND.

Degut a la sobreexpressió de reguladors positius de les CDKs (com les ciclines) i la inactivació dels inhibidors de CDKs, l'activitat de les CDKs en el càncer està incrementada (Malumbres et al., 2008). Això posa de manifest la importància de la recerca d'inhibidors de CDKs amb aplicacions terapèutiques. Per tant, l'existència d'una altra ciclina capaç d'activar CDK6 obre noves vies respecte l'ús dels inhibidors de CDK4/6 a la pràctica clínica. Fins ara, l'únic marcador que s'utilitza per decidir si s'administren inhibidors CDK4/6 és la pèrdua de funció de pRb, que no és gaire freqüent, a diferència de les alteracions genètiques de CCND1 molt més comunes, però de la qual el seu valor predictiu és més complicat de ser establert (Erik S Knudsen & Witkiewicz, 2017). La identificació del complex CCNI-CDK6 permet un major coneixement de la maquinària genètica tumoral que podria ajudar a determinar la sensibilitat a inhibidors CDK4/6. Però encara més, si es té en compte que normalment qui està sobreexpressada o sobreactivada en càncer és la ciclina, aquestes són la clau per dissenyar teràpies dirigides. El problema és que aconseguir fàrmacs per inhibir l'activitat desregulada de la ciclina en càncer és tot un repte, ja que aquestes es situen a nivell intracel·lular i no posseeixen activitat enzimàtica intrínseca (Musgrove et al., 2011). Tot i així, les innovacions terapèutiques de les últimes dècades estan permetent que aquesta idea cada vegada sigui més una realitat. Així, tenint en compte que CDK6 té un paper fisiològic important, CCNI suposa una nova diana per dissenyar una teràpia dirigida eficaç i que suposi menys toxicitat.

També quedaria per indagar el paper de CCNI en altres fenotips diferents de proliferació que també són mediatos per CDK6. Per exemple, CDK6 és capaç d'induir la transcripció de  $p16^{INK4b}$  i el factor VEGF-A de manera cinasa independent, tot i que pel primer necessita la participació de CCND i, en canvi la inducció del factor VEGF-A és independent d'aquesta ciclina i es desconeix amb quina ciclina ho fa (Kollmann et al., 2013). Seria interessant estudiar si CCNI-CDK6 també duen a terme funcions cinasa independent, i a més determinar si la inducció del factor VEGF-A per part de CDK6 ho fa conjuntament amb CCNI aportant un possible rol en angiogènesi.

Finalment caldria explorar el paper fisiològic de CCNI. S'ha demostrat que CCNE interacciona amb un conjunt de proteïnes diferents respecte el teixit, donant suport a que les ciclines duen a terme funcions específiques de teixit (Odajima et al., 2016). Aquest punt es podria centrar en el sistema hematopoètic ja que en aquest, CDK6 mostra un rol específic que no pot ser compensat per CDK4 (Malumbres and Barbacid, 2005). Així en línies hematopoètiques on CDK6 juga un paper determinat, analitzar el complex CCNI-CDK6 podria ser un punt de partida.

En definitiva, s'ha mostrat que CCNI activa CDK6 per incrementar la proliferació cel·lular tumoral evocant que CCNI és una altra peça del trencaclosques del cicle cel·lular i un nou potencial conductor oncogènic.



## CONCLUSIONS

---

## Conclusions

1. El complex CCNI-CDK6 és actiu contra pRb *in vitro* i en línies cel·lulars tumorals.
2. La sobreexpressió de CCNI augmenta la proliferació de línies cel·lulars de càncer, especialment les de càncer de mama.
3. La quantitat expressada de CCNI s'associa amb el creixement tumoral *in vivo* de la línia de càncer de mama MDA-MB-231.
4. L'increment de la proliferació cel·lular produït per la sobreexpressió de CCNI és CDK6-dependent i es pot inhibir per palbociclib.
5. L'expressió augmentada de CCNI correlaciona amb l'expressió de gens regulats pel factor de transcripció E2F en un panell de 1.304 línies cel·lulars del portal DepMap.
6. L'expressió augmentada de CCNI correlaciona amb l'expressió de gens regulats pel factor de transcripció E2F en un panell de 269 pacients de càncer de mama de la base de dades TCGA.
7. La majoria de càncers presenten nivells mitjos/alts de CCNI.

## Conclusions

## BIBLIOGRAFIA

---



## Bibliografia

- Albihn, A., Johnsen, J. I., & Arsenian Henriksson, M. (2010). MYC in Oncogenesis and as a Target for Cancer Therapies. In *Advances in Cancer Research*. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(10\)07006-5](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(10)07006-5)
- Asghar, U., Witkiewicz, A. K., Turner, N. C., & Knudsen, E. S. (2015). The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(2), 130–146. Retrieved from <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrd4504>
- Bertoli, C., Skotheim, J. M., & De Bruin, R. A. M. (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(8), 518–528. <https://doi.org/10.1038/nrm3629>
- Blethrow, J. D., Glavy, J. S., Morgan, D. O., & Shokat, K. M. (2008). Covalent capture of kinase-specific phosphopeptides reveals Cdk1-cyclin B substrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708966105>
- Brinkkoetter, P. T., Olivier, P., Wu, J. S., Henderson, S., Krofft, R. D., Pippin, J. W., ... Shankland, S. J. (2009). Cyclin I activates Cdk5 and regulates expression of Bcl-2 and Bcl-XL in postmitotic mouse cells. *Journal of Clinical Investigation*, 119(10), 3089–3101. <https://doi.org/10.1172/JCI37978>
- Card, G. L. (2000). Crystal structure of a gamma-herpesvirus cyclin-cdk complex. *The EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.12.2877>
- Choi, Y. J., & Anders, L. (2014). Signaling through cyclin D-dependent kinases. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.137>
- Clotet, J., Escoté, X., Adrover, M. Á., Yaakov, G., Garí, E., Aldea, M., ... Posas, F. (2006). Phosphorylation of Hsl1 by Hog1 leads to a G2 arrest essential for cell survival at high osmolarity. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601095>
- Cybulski, M., Jarosz, B., Nowakowski, A., Jeleniewicz, W., Seroczyński, P., & Mazurek-Kociubowska, M. (2012a). Cyclin I correlates with VEGFR-2 and cell proliferation in human epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 127(1), 217–222. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.06.038>
- Cybulski, M., Jarosz, B., Nowakowski, A., Jeleniewicz, W., Seroczyński, P., & Mazurek-Kociubowska, M. (2012b). Cyclin i correlates with VEGFR-2 and cell proliferation in human epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.06.038>
- Cybulski, M., Jeleniewicz, W., Nowakowski, A., Stenzel-bembenek, A., & Tarkowski, R. (2015). *Cyclin I mRNA Expression Correlates with Kinase Insert Domain Receptor Expression in Human Epithelial Ovarian Cancer*. 1120, 1115–1119.
- Dick, F. A., & Rubin, S. M. (2013). Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm3567>

## Bibliografia

- Ehab, M., & Elbaz, M. (2016). Profile of palbociclib in the treatment of metastatic breast cancer. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 8, 83–91. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S83146>
- Elbæk, C. R., Petrosius, V., & Sørensen, C. S. (2020). WEE1 kinase limits CDK activities to safeguard DNA replication and mitotic entry. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2020.111694>
- Fischer, M., Grossmann, P., Padi, M., & DeCaprio, J. A. (2016). Integration of TP53, DREAM, MMB-FOXM1 and RB-E2F target gene analyses identifies cell cycle gene regulatory networks. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw523>
- Gao, J., Aksoy, B. A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S. O., ... Schultz, N. (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science Signaling*. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004088>
- Gasa, L., Quandt, E., & Jiménez, J. (2017). *OPEN A systematic analysis of orphan cyclins reveals CNTD2 as a new oncogenic driver in lung cancer*. (August), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10770-8>
- Gasa, L., Sanchez-Botet, A., Quandt, E., Hernández-Ortega, S., Jiménez, J., Carrasco-García, M. A., ... Clotet, J. (2017). A systematic analysis of orphan cyclins reveals CNTD2 as a new oncogenic driver in lung cancer. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10770-8>
- Ghandi, M., Huang, F. W., Jané-Valbuena, J., Kryukov, G. V., Lo, C. C., McDonald, E. R., ... Sellers, W. R. (2019). Next-generation characterization of the Cancer Cell Line Encyclopedia. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1186-3>
- Goel, G. (2018). Evolution of regorafenib from bench to bedside in colorectal cancer: Is it an attractive option or merely a “me too” drug? *Cancer Management and Research*. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S88825>
- Gridelli, C., Rossi, A., Carbone, D. P., Guarize, J., Karachaliou, N., Mok, T., ... Rosell, R. (2015). Non-small-cell lung cancer. *Nature Reviews Disease Primers*. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.9>
- Griffin, S. V., Olivier, J. P., Pippin, J. W., Roberts, J. M., & Shankland, S. J. (2006). Cyclin I protects podocytes from apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(38), 28048–28057. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513336200>
- Gyorffy, B., Surowiak, P., Budczies, J., & Lánczky, A. (2013). Online survival analysis software to assess the prognostic value of biomarkers using transcriptomic data in non-small-cell lung cancer. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082241>
- Hagmann, H., Taniguchi, Y., Pippin, J. W., Kauerz, H. M., Benzing, T., Shankland, S. J., & Brinkkoetter, P. T. (2015). Cyclin I and p35 determine the subcellular

- distribution of Cdk5. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*.  
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00168.2014>
- Hallett, S. T., Pastok, M. W., Morgan, R. M. L., Wittner, A., Blundell, K. L. I. M., Felletar, I., ... Endicott, J. A. (2017). Differential Regulation of G1 CDK Complexes by the Hsp90-Cdc37 Chaperone System. *Cell Reports*.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.042>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hartwell, L. H. (1971). Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Experimental Cell Research*.  
[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(71\)90223-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(71)90223-0)
- Hartwell, Leland H., & Weinert, T. A. (1989). Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.2683079>
- Hydbring, P., Malumbres, M., & Sicinski, P. (2016a). Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17(5), 280–292. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.27.Non-canonical>
- Hydbring, P., Malumbres, M., & Sicinski, P. (2016b). Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. *Nature Publishing Group*.  
<https://doi.org/10.1038/nrm.2016.27>
- Johnson, J., Thijssen, B., McDermott, U., Garnett, M., Wessels, L. F. A., & Bernards, R. (2016). Targeting the RB-E2F pathway in breast cancer. *Oncogene*, 35(37), 4829–4835. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.32>
- Kawai, T., Morita, K., Masuda, K., Nishida, K., Shikishima, M., Ohta, M., ... Rokutan, K. (2007). Gene expression signature in peripheral blood cells from medical students exposed to chronic psychological stress. *Biological Psychology*, 76(3), 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2007.07.008>
- Kent, L. N., & Leone, G. (2019). The broken cycle: E2F dysfunction in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 19, 326–338. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0143-7>
- Klein, M. E., Kovatcheva, M., Davis, L. E., Tap, W. D., & Koff, A. (2018). CDK4/6 Inhibitors: The Mechanism of Action May Not Be as Simple as Once Thought. *Cancer Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.023>
- Knudsen, E S, & Wang, J. Y. (1997). Dual mechanisms for the inhibition of E2F binding to RB by cyclin-dependent kinase-mediated RB phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*, 17(10), 5771–5783. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.10.5771>
- Knudsen, Erik S, & Witkiewicz, A. K. (2017). The Strange Case of CDK4/6 Inhibitors: Mechanisms, Resistance, and Combination Strategies. *Trends Cancer*, 3(1), 39–55. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.11.006>

## Bibliografia

- Kollmann, K., Heller, G., Schneckenleithner, C., Warsch, W., Scheicher, R., Ott, R. G., ... Sexl, V. (2013). A kinase-independent function of CDK6 links the cell cycle to tumor angiogenesis. *Cancer Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.07.012>
- Koveitypour, Z., Panahi, F., Vakilian, M., Peymani, M., Seyed Forootan, F., Nasr Esfahani, M. H., & Ghaedi, K. (2019). Signaling pathways involved in colorectal cancer progression. *Cell and Bioscience*. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0361-4>
- Kozar, K., & Sicinski, P. (2005). Cell cycle progression without cyclin D-CDK4 and cyclin D-CDK6 complexes. *Cell Cycle*. <https://doi.org/10.4161/cc.4.3.1551>
- Landberg, G., Nilsson, K., Jirström, K., Rydén, L., Kitching, R., Burger, A. M., & Seth, A. (2005). Cyclin I is expressed in human breast cancer and closely associated with VEGF and KDR expression. *Breast Cancer Research and Treatment*, 89(3), 313–316. <https://doi.org/10.1007/s10549-004-2230-y>
- Lemmens, B., & Lindqvist, A. (2019). DNA replication and mitotic entry: A brake model for cell cycle progression. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/JCB.201909032>
- Li, R., Liu, G. Z., Luo, S. Y., Chen, R., & Zhang, J. X. (2015). Cyclin i promotes cisplatin resistance via Cdk5 activation in cervical cancer. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 19(23), 4533–4541.
- Liberzon, A., Birger, C., Thorvaldsdóttir, H., Ghandi, M., Mesirov, J. P., & Tamayo, P. (2015). The Molecular Signatures Database Hallmark Gene Set Collection. *Cell Systems*. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2015.12.004>
- Lim, S., & Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: Roles beyond cell cycle regulation. *Development (Cambridge)*. <https://doi.org/10.1242/dev.091744>
- Liu, M., Liu, H., & Chen, J. (2018). Mechanisms of the CDK4/6 inhibitor palbociclib (PD 0332991) and its future application in cancer treatment (Review). *Oncology Reports*. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6221>
- Lolli, G., & Johnson, L. N. (2005). CAK-Cyclin-Dependent Activating Kinase: A key kinase in cell cycle control and a target for Drugs? *Cell Cycle*. <https://doi.org/10.4161/cc.4.4.1607>
- Lukas, J., Bartkova, J., Rohde, M., Strauss, M., & Bartek, J. (1995). Cyclin D1 is dispensable for G1 control in retinoblastoma gene-deficient cells independently of cdk4 activity. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.15.5.2600>
- Malumbres, M. (2011). Physiological Relevance of Cell Cycle Kinases. *Physiological Reviews*, 91(3), 973–1007. <https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2010>
- Malumbres, Marcos. (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology*, 15(6), 122. <https://doi.org/10.1186/gb4184>

- Malumbres, Marcos, & Barbacid, M. (2001). To cycle or not to cycle: A critical decision in cancer. *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/35106065>
- Malumbres, Marcos, & Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(11), 630–641. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.09.005>
- Malumbres, Marcos, & Barbacid, M. (2009a). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 9(3), 153–166. <https://doi.org/10.1038/nrc2602>
- Malumbres, Marcos, & Barbacid, M. (2009b). Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 9(3), 153–166. <https://doi.org/10.1038/nrc2602>
- Malumbres, Marcos, Harlow, E., Hunt, T., Hunter, T., Lahti, J. M., Manning, G., ... Wolgemuth, D. J. (2009). Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nature Cell Biology*, 11(11), 1275–1276. <https://doi.org/10.1038/ncb1109-1275>
- Malumbres, Marcos, Pevarello, P., Barbacid, M., & Bischoff, J. R. (2008). CDK inhibitors in cancer therapy: what is next? *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(1), 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.10.012>
- Mikolcevic, P., Sigl, R., Rauch, V., Hess, M. W., Pfaller, K., Barisic, M., ... Geley, S. (2012). Cyclin-dependent kinase 16/PCTAIRE kinase 1 is activated by cyclin Y and is essential for spermatogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 32(4), 868–879. <https://doi.org/10.1128/MCB.06261-11>
- Morgan, D. O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature*, 374(6518), 131–134. <https://doi.org/10.1038/374131a0>
- Murray, A. W. (2004). Recycling the Cell Cycle: Cyclins Revisited. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01080-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01080-8)
- Musgrove, E. A., Caldon, C. E., Barraclough, J., Stone, A., & Sutherland, R. L. (2011). Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 11(8), 558–572. <https://doi.org/10.1038/nrc3090>
- Nagano, T., Hashimoto, T., Nakashima, A., Hisanaga, S., Kikkawa, U., & Kamada, S. (2013). Cyclin I is involved in the regulation of cell cycle progression. *Cell Cycle*, 12(16), 2617–2624. <https://doi.org/10.4161/cc.25623>
- Nakamura, T., Sanokawa, R., Sasaki, Y. F., Ayusawa, D., Oishi, M., & Mori, N. (1995). Cyclin I: A New Cyclin Encoded by a Gene Isolated from Human Brain. *Experimental Cell Research*, 221(2), 534–542. <https://doi.org/10.1006/excr.1995.1406>
- Nebreda, A. R. (2006). CDK activation by non-cyclin proteins. *Current Opinion in Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.01.001>
- Nurse, P. (2004). Wee beasties. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/432557a>

## Bibliografia

- Nurse, P., & Bissett, Y. (1981). Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G 2 for control of mitosis in fission yeast. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/292558a0>
- Odajima, J., Saini, S., Jung, P., Ndassa-colday, Y., Ficaro, S., Geng, Y., ... Sicinski, P. (2016). *Proteomic Landscape of Tissue-Specific Cyclin E Functions in Vivo*. 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006429>
- Örd, M., Venta, R., Möll, K., Valk, E., & Loog, M. (2019). Cyclin-Specific Docking Mechanisms Reveal the Complexity of M-CDK Function in the Cell Cycle. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.04.026>
- Ortiz, A. B., Garcia, D., Vicente, Y., Palka, M., Bellas, C., & Martin, P. (2017). Prognostic significance of cyclin D1 protein expression and gene amplification in invasive breast carcinoma. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188068>
- Pandey, K., An, H. J., Kim, S. K., Lee, S. A., Kim, S., Lim, S. M., ... Moon, Y. W. (2019). Molecular mechanisms of resistance to CDK4/6 inhibitors in breast cancer: A review. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.32020>
- Pelengaris, S., Rudolph, B., & Littlewood, T. (2000). Action of Myc in vivo — proliferation and apoptosis. *Current Opinion in Genetics & Development*, 10(1), 100–105. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(99\)00046-5](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(99)00046-5)
- Qiu, L., Wang, J. J., Ying, S. H., & Feng, M. G. (2015). Wee1 and Cdc25 control morphogenesis, virulence and multistress tolerance of *Beauveria bassiana* by balancing cell cycle-required cyclin-dependent kinase 1 activity. *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12530>
- Quandt, E., Ribeiro, M. P. C., & Clotet, J. (2020a). Atypical cyclins : the extended family portrait. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77, 231–242. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03262-7>
- Quandt, E., Ribeiro, M. P. C., & Clotet, J. (2020b). Atypical cyclins in cancer: New kids on the block? *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 107(February), 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.04.018>
- Quandt Herrera, E. (2017). *Caracterización de complejos CDK-ciclina atípicos humanos*. Universitat Internacional de Catalunya.
- Romero-Pozuelo, J., Figlia, G., Kaya, O., Martin-Villalba, A., & Teleman, A. A. (2020). Cdk4 and Cdk6 Couple the Cell-Cycle Machinery to Cell Growth via mTORC1. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.03.068>
- Russo, A. A., Tong, L., Lee, J. O., Jeffrey, P. D., & Pavletich, N. P. (1998). Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16(INK4a). *Nature*. <https://doi.org/10.1038/26155>
- Sadasivam, S., & DeCaprio, J. A. (2013). The DREAM complex: Master coordinator of cell cycle-dependent gene expression. *Nature Reviews Cancer*.

- <https://doi.org/10.1038/nrc3556>
- Santamaría, D., Barrière, C., Cerqueira, A., Hunt, S., Tardy, C., Newton, K., ... Barbacid, M. (2007). Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature06046>
- Schade, A. E., Oser, M. G., Nicholson, H. E., & DeCaprio, J. A. (2019). Cyclin D–CDK4 relieves cooperative repression of proliferation and cell cycle gene expression by DREAM and RB. *Oncogene*, *38*(25), 4962–4976. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0767-9>
- Schafer, K. A. (1998). The Cell Cycle: A Review. *Veterinary Pathology*. <https://doi.org/10.1177/030098589803500601>
- Scott, S. C., Lee, S. S., & Abraham, J. (2017). Mechanisms of therapeutic CDK4/6 inhibition in breast cancer. *Seminars in Oncology*. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2018.01.006>
- Shehata, S. N., Deak, M., Morrice, N. A., Ohta, E., Hunter, R. W., Kalscheuer, V. M., & Sakamoto, K. (2015). Cyclin Y phosphorylation- and 14-3-3-binding-dependent activation of PCTAIRE-1/CDK16. *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/BJ20150486>
- Sherman-Baust, C. A., Weeraratna, A. T., Rangel, L. B. A., Pizer, E. S., Cho, K. R., Schwartz, D. R., ... Morin, P. J. (2003). Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Cell*, *3*(4), 377–386. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00058-8](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00058-8)
- Sherr, C. J. (2006). Divorcing ARF and p53: An unsettled case. *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc1954>
- Soamalala, J., Diot, S., Pellerano, M., Blanquart, C., Galibert, M., Jullian, M., ... Morris, M. C. (2021). Fluorescent Peptide Biosensor for Probing CDK6 Kinase Activity in Lung Cancer Cell Extracts. *ChemBioChem*. <https://doi.org/10.1002/cbic.202000677>
- Stamatakis, M., Palla, V., Karaiskos, I., Xiromeritis, K., Alexiou, I., Pateras, I., & Kontzoglou, K. (2010). Cell cyclins: Triggering elements of cancer or not? *World Journal of Surgical Oncology*. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-8-111>
- Tatum, N. J., & Endicott, J. A. (2020). Chatterboxes: the structural and functional diversity of cyclins. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2020.04.021>
- Topacio, B. R., Zatulovskiy, E., Cristea, S., Sage, J., Ko, M., Skotheim, J. M., ... Rubin, S. M. (2019). Cyclin D-Cdk4, 6 Drives Cell-Cycle Progression via the Retinoblastoma Protein's C-Terminal Helix. 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.03.020>
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A.,



## Bibliografia

- ... Pontén, F. (2015). Tissue-based map of the human proteome. *Science*.  
<https://doi.org/10.1126/science.1260419>
- Yu, Q., Geng, Y., & Sicinski, P. (2001). Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/35082500>
- Zhang, L., Xiao, H., Zhou, H., Santiago, S., Lee, J. M., Garon, E. B., ... Wong, D. T. W. (2012a). Development of transcriptomic biomarker signature in human saliva to detect lung cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-012-1027-0>
- Zhang, L., Xiao, H., Zhou, H., Santiago, S., Lee, J. M., Garon, E. B., ... Wong, D. T. W. (2012b). Development of transcriptomic biomarker signature in human saliva to detect lung cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(19), 3341–3350. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1027-0>