

Interacció p45^{SKP2}-CksHs1 i la seva funció en la regulació dels complexos Ciclina A/CDK2 del cicle cel·lular

Tesi presentada per
LÍDIA MONGAY SOLER
per optar al grau de
DOCTOR EN MEDICINA

Directors: Dr. Carles Serra Pagès
Dr. Jordi Vives Puiggròs

Tutor: Prof. Dr. Carles Enrich Bastús

Barcelona, juny 2001

AGRAÏMENTS

Ningú fa res sol i això no és una excepció. Aquest és un treball fet per un equip, petit però equip. Moltes coses no s'haguessin pogut fer sense el Carles Serra, qui m'ha ensenyat, a més, a treballar eficientment i a valorar les coses de manera crítica. Al Jordi Vives vull agrair-li el fet que em contagiés el seu entusiasme per a l'estudi del cicle cel·lular, però, sobretot, el seu suport i comprensió en moments difícils. Aquest grup no seria el que és sense la Elena Vigorito, a qui agraeixo especialment les seves pinzellades d'ironia capaces de transformar en divertida qualsevol situació. A la Susana Plaza i a l'Anna Ibáñez voldria agrair-los la seva amistat, consolidada en un cas i més jove en l'altre, establerta al llarg de tantes hores de feina. Voldria també expressar el meu agraïment a la Merçè Bayó, especialista en fer que semblin senzilles les coses complicades.

Finalment voldria fer extensiu el meu agraïment a tots els becaris i a tot el personal mèdic, tècnic i administratiu del servei d'Immunologia de l'Hospital Clínic.

CONTINGUTS

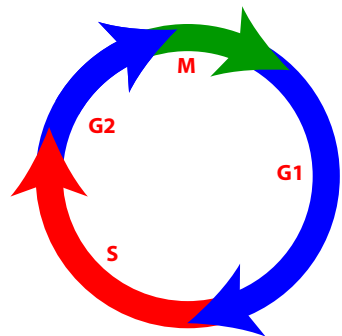
I. INTRODUCCIÓ	9
1. El cicle cel·lular eucariota	11
2. El cicle cel·lular en mamífers	12
3. Complexes ciclina/CDK. Estructura, funció i regulació	19
4. Complexes Ciclina A/CDK2. Estructura	23
5. Complexes Ciclina A/CDK2. Funció	24
6. Complexes Ciclina A/CDK2. Regulació	26
7. p45 ^{SKP2} . Proteïna integrant dels complexos Ciclina A/CDK2	30
8. CksHs1. Proteïna integrant dels complexos Ciclina A/CDK2	33
II. HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIU	37
III. MATERIALS I MÈTODES	41
1. Material biològic	43
1.1. Cèl·lules	43
1.2. Anticossos	43
1.3. Plàsmids	44
2. Tècniques de biologia molecular	46
2.1. Extracció i purificació de DNA plasmídic	46

Preparació de DNA plasmídic a petita escala (Mètode de lisi alcalina)	46
Preparació de DNA plasmídic a gran escala	47
Purificació de fragments de DNA	47
2.2. Subclonació de DNA en vectors plasmídics	48
Digestió amb enzims de restricció	48
Desfosforilació de DNA linealitzat	48
Reacció de lligació d'un fragment de DNA en un plàsmid	49
2.3. Preparació i transformació de bacteris E. coli competents	50
Preparació de bacteris competents per xoc tèrmic (Mètode de clorur de cobalt d'hexamina/DMSO)	50
Transformació de bacteris per xoc tèrmic	51
2.4. Electroforesi de DNA en gels d'agarosa	52
2.5. Seqüenciació nucleotídica automàtica	52
2.6. Reacció en cadena de la polimerassa (PCR)	53
2.7. Generació de mutants	54
Mutacions puntuals	54
Mutacions per selecció	55
3. Tècniques amb llevats	56
3.1. Tècnica Interaction-trap	56
Descripció de la tècnica	56
Plàsmids d'expressió de proteïnes de fusió, soques de llevat, reporters i llibreries	59
Screening o Interactor-hunt	62
3.2. Transformació de llevats	68
3.3. Extracció de DNA plasmídic dels llevats	69
3.4. Assaig líquid per a la mesura de l'activitat β -Galactosidasa	70
3.5. Medis de cultiu	71

4. Tècniques bioquímiques i de biologia cel·lular	74
4.1. Detecció de l'expressió proteica	74
Electroforesi de proteïnes en gel amb SDS (SDS-PAGE) i detecció de proteïnes mitjançant tinció	74
Detecció de proteïnes mitjançant Western-blot	75
4.2. Expressió i purificació de proteïnes de fusió en <i>E. coli</i>	76
Expressió i purificació de la proteïna de fusió His-CksHs1 en <i>E. coli</i>	76
Expressió i purificació de la proteïna de fusió GST-p21 ^{Cip1} en <i>E. coli</i>	78
4.3. Expressió de proteïnes de fusió en eucariotes	81
Transfecció de cèl·lules Cos-7 (Mètode DEAE-Dextran)	81
4.4. Lisi de cèl·lules i precipitació de proteïnes	82
4.5. Assaig de quinasses de CDK2	83
4.6. Immunohistoquímica	83
 IV. RESULTATS	 87
1. p45 ^{SKP2} interacciona amb CksHs1	89
2. P45 ^{SKP2} i CksHs1 interaccionen in vivo	93
3. El domini carboxi-terminal de p45 ^{SKP2} interacciona amb CksHs1	97
4. Diferents parts de CksHs1 interaccionen amb p45 ^{SKP2} i CDK2	101
5. CksHs1 modula la interacció entre CDK2 i p45 ^{SKP2}	104
6. p45 ^{SKP2} i CksHs1 formen complexos amb CDK2 de manera mútuament excloent	108

7. La sobreexpressió de CksHs1 inhibeix l'activitat quinassa de CDK2	113
8. La sobreexpressió de CksHs1 inhibeix l'activitat quinassa de CDK2 per un mecanisme indirecte	116
9. La sobreexpressió de p45 ^{SKP2} restableix l'activitat quinassa basal de CDK2 inhibida per CksHs1	119
10. El CDK2 unit a CksHs1 té la Tyr-15 fosforilada i el CDK2 unit a p45 ^{SKP2} no té la Tyr-15 fosforilada	123
11. p45 ^{SKP2} interacciona amb GATE-16GEF2	127
12. p45 ^{SKP2} interacciona amb la proteïna c-89	129
13. A diferència de p45 ^{SKP2} , CksHs1, CDK2 i GATE-16-GEF2 la proteïna c-89 té localització citoplasmàtica	131
14. p45 ^{SKP2} i la proteïna c-89 colocalitzen formant agregats citoplasmàtics	133
V. DISCUSSIÓ	137
VI. CONCLUSIONS	153
VII. BIBLIOGRAFIA	157
VIII. PUBLICACIONS	181

I. INTRODUCCIÓ



1. El cicle cel·lular eucariota

El nom de cicle cel·lular fa referència al conjunt de processos necessaris per a la divisió d'una cèl·lula, la qual té com a funció fonamental la transmissió de la informació genètica d'una generació cel·lular a la següent donant lloc a dues cèl·lules filles plenament funcionals. El cicle cel·lular és un procés general que afecta a tota la cèl·lula i durant el qual tenen lloc un gran nombre de processos que cal coordinar en l'espai i en el temps. Per exemple, el cicle cromosòmic consisteix en la replicació, condensació i segregació del DNA amb la síntesi i ensamblatge de forma paral·lela de les proteïnes que formen part del cromosoma. La separació citoplasmàtica requereix la formació del fus mitòtic i l'acció dels microtúbuls, entre d'altres. A més, cal la coordinació d'altres esdeveniments com la reproducció i migració d'òrgànuls, morfogènesi del citoesquelet o formació de membranes i el manteniment dels processos cel·lulars normals com síntesi proteica i de RNA.

La progressió durant el cicle cel·lular està organitzada en fases o transicions unidireccionals que impliquen canvis en l'activitat cel·lular per a desencadenar els processos següents. El cicle cel·lular eucariota pot dividir-se en quatre fases. Així, la transmissió de la informació genètica requereix una acurada replicació del DNA durant la fase S (fase de síntesi) i una igualment acurada segregació de les cromàtides germanes resultants durant la fase M (fase de mitosi). En la majoria de cèl·lules eucariotes la fase S i la fase M estan separades per les fases anomenades G (gap); G1 abans de la replicació del DNA i G2 abans de la mitosi. Aquestes fases son normalment dependents les unes de les altres i s'esdevenen en cicles repetitius oscil·ladors.

L'acurada coordinació de la progressió del cicle cel·lular al llarg de totes les seves fases és crítica no només per a la divisió cel·lular normal, sinó també quan cal una aturada cel·lular efectiva en determinades condicions com, per exemple, el dany al DNA o l'estrès cel·lular. A més, un mal funcionament de la maquinària del cicle cel·lular pot comportar un creixement cel·lular incontrolat, principal característica d'un procés neoplàssic. En aquest sentit, les disregulacions en la maquinària del cicle cel·lular objectivades en les cèl·lules malignes pròpies de diversos tumors

humans, ha comportat l'estudi i assaig de noves teràpies antitumorals basades en el coneixement i la funció dels diversos components del cicle cel·lular. Aquest és, sense cap dubte, un camp emergent en la recerca biomèdica la qual té com a una de les seves prioritats fonamentals la lluita contra el càncer.

Les transicions entre les successives fases del cicle cel·lular normal son regulades pels complexos formats per dues famílies de proteïnes, les ciclines i les CDKs (*cyclin-dependent protein kinases*). La regulació dependent dels complexos ciclina/CDK és pròpia de tots els organismes eucariotes i ja hi ha homòlegs d'aquests complexos en organismes eucariotes tan llunyans al nostre com llevats, metazous o granotes *Xenopus*. En els llevats, per exemple, la progressió del cicle cel·lular està predominantment controlada per una única CDK producte del gen CDC (*cell division cycle*) anomenada *cdc2* en *Schizosaccharomyces pombe* i CDC28 en *Saccharomyces cerevisiae*. En metazous, en canvi, les diferents fases del cicle cel·lular ja requereixen l'acció de diferents CDKs. La primera CDK identificada en organismes vertebrats va ser p34^{cdc2} (també anomenada CDK1) i va resultar ser la subunitat catalítica del factor promotor de la fase M (MPF), un inductor universal de la mitosi. En humans hi ha actualment identificades un gran nombre de ciclines i CDKs implicades en la regulació de les diferents fases del cicle cel·lular.

2. El cicle cel·lular en mamífers

En els mamífers com en els llevats, és característica i necessària la seqüència ordenada de totes les fases del cicle; la replicació del genoma abans de la mitosi així com les fases intermèdies. Aquesta seqüència ordenada de fases és el resultat d'una complexa xarxa de mecanismes reguladors que actuen sobre els principals protagonistes d'aquest procés: els complexos formats per ciclines i CDKs.

La proliferació cel·lular en mamífers en resposta a senyals extracel·lulars és vehiculitzada per factors de creixement que inicien una cascada d'esdeveniments que donen lloc a creixement cel·lular i divisió. En les vies de senyalització intracel·lular

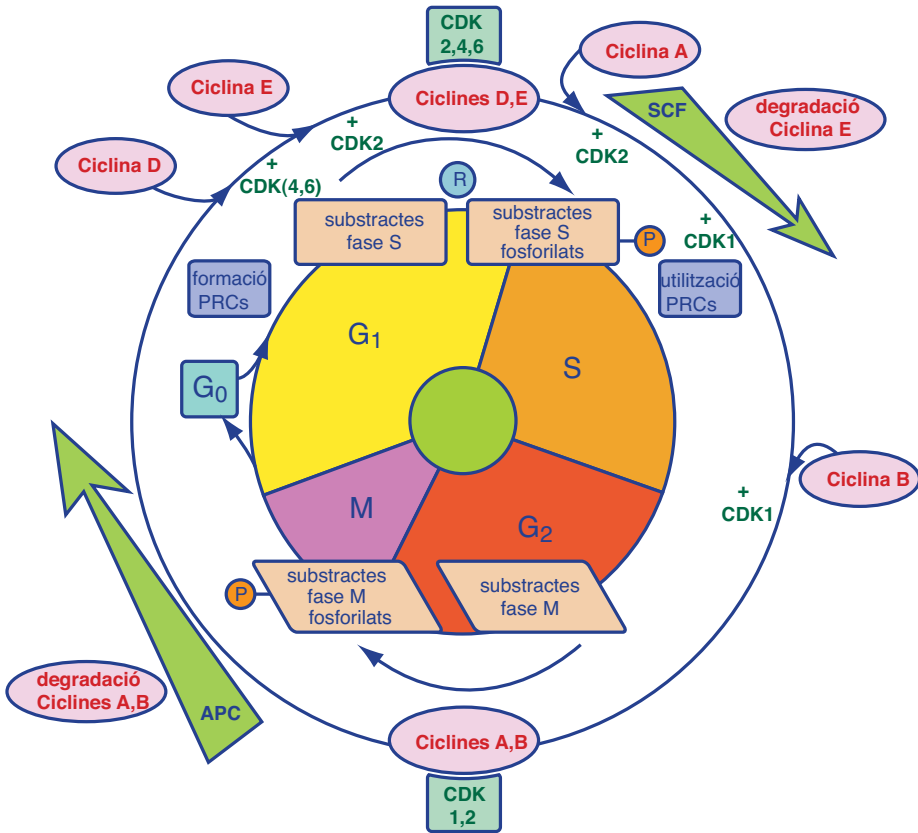


Figura 1. El cicle cel·lular en mamífers. En resposta a factors intra i/o extracel·lulars les cèl·lules progressen de G₀ a G₁ i per G₁ mitjançant la formació de complexos entre les Ciclines D i CDK(4, 6), els quals permeten la fosforilació de Rb i E2F i la inducció de l'expressió de Ciclina E. A l'inici de la fase G₁ es formen els complexos pre-replicatius PRCs (*pre-replication complexes*) als orígens de replicació del DNA. Els complexos Ciclina E/CDK2 i Ciclines D/CDK(4, 6) possibiliten la progressió de la cèl·lula per el punt de restricció (R) i l'entrada a fase S. L'expressió de Ciclina E és màxima en la transició G₁/S i els complexos Ciclina E/CDK2 i Ciclina A/CDK2 fosforilant substrats claus per a la fase S i són necessaris per a l'inici de la replicació del DNA i per a la progressió per la fase S. Els complexos Ciclina A/CDK2 s'acumulen en la fase S i promouen el pas de S a G₂. La degradació proteolítica de proteïnes efectores o reguladores, entre elles ciclines o proteïnes inhibidores, que ja no són necessàries és duta a terme pels complexos SCF (*SKP1-Cullin-F-box*). Els complexos Ciclina B/CDK1 s'acumulen a la fase G₂ i induïxen la mitosi fosforilant substrats claus per al desenvolupament de la fase M. En aquest moment la degradació proteolítica de proteïnes efectores o reguladores, entre elles ciclines, que ja no són necessàries és duta a terme pels complexos APC (*anaphase-promoting-complex*).

que relacionen els senyals mitogènics extracel·lulars amb la maquinària del cicle cel·lular les proteïnes *Ras GTP-binding proteins* hi tenen un paper cabdal. Davant un estímul mitogènic s'indueix una via de senyalització depenent de Ras i d'una cascada de quinasses que consisteix en l'activitat seqüencial de Raf-1, MEK1 i MEK2 (*mitogen-activated protein kinase kinase*) i ERKs (*extracel·lular signal-regulated protein kinases*), entre d'altres. El resultat de la inducció d'aquesta via de senyalització és, entre d'altres, la transcripció de la Ciclina D1 (Aktas et al., 1997; Albanese et al., 1995; Filmus et al., 1994; Kerkhoff and Rapp, 1997; Lavoie et al., 1996; Weber et al., 1997; Winston et al., 1996). Una vegada iniciat el cicle les cèl·lules de mamífers progressen des de la fase G0 fins a la fase inicial anomenada G1 en la qual la cèl·lula assoleix la mida necessària i produeix i activa les proteïnes adequades per a poder passar a la següent fase, la fase S o de replicació del DNA.

La fase G1 és l'única fase del cicle cel·lular sensible a l'acció de factors de creixement extracel·lulars; aquests actuen unint-se a receptors específics i desencadenant cascades de senyalització que permeten la progressió del cicle. El terme "punt de restricció" (R) (Pardee, 1989) fa referència a un moment al final de la fase G1 a partir del qual no són necessaris més estímuls mitogènics i la cèl·lula segueix inexorablement la seva progressió pel cicle cel·lular, procés que a partir d'aquest punt esdevé ja independent de qualsevol estímul extern. En la connexió entre l'ambient extracel·lular i l'inici i progressió del cicle cel·lular és fonamental la fosforilació de la proteïna pRb la qual està regulada per les CDKs de la fase G1 i, més endavant, per les CDKs de la fase S.

pRb, el producte del gen supressor del retinoblastoma, és una proteïna clau pel pas de G1 a S i per la progressió de la fase S (Ewen, 1994; Weinberg, 1995) perquè controla l'expressió dels gens necessaris en aquests moments. pRb exerceix control sobre els factors de transcripció de la família E2F/DP (Kouzarides, 1995). Els factors de transcripció de la família E2F/DP s'uneixen a les seqüències promotores dels gens necessaris per a la progressió de la fase G1 a la fase S i n'indueixen l'expressió. Aquests gens inclouen els gens codificants de c-myc, N-myc, B-myb, cdc2, Ciclina E, Ciclina A, dihidrofolat reductassa, timidina sintetassa, timidina

quinassa i DNA polimerassa α (Adams and Kaelin, 1995; Dalton, 1992; Dou et al., 1992; Geng et al., 1996; Karlseder et al., 1996; Means et al., 1992; Mudryj et al., 1990; Ogris et al., 1993; Pearson et al., 1991; Reed et al., 1992; Sherr, 1996). Les formes heterodimèriques lliures de E2F/DP activen la transcripció però la interacció dels factors E2F/DP amb el pRb en forma no fosforilada evita l'activació de la transcripció dels gens dependents dels E2F/DP (Chellappan et al., 1991; Helin et al., 1993; Nevins, 1992; Weintraub, 1993). Així, en cèl·lules no proliferants pRb està en forma no fosforilada, forma que evita la transcripció i que es considera activa en reprimir la progressió del cicle. En canvi, durant la progressió per G1/S, pRb es fosforila i la forma hiperfosforilada no manté units els factors de transcripció E2F/DP els quals esdevenen transcripcionalment actius. Per tant, la forma hiperfosforilada de pRb permet la transcripció dels gens necessaris pel pas de G1 a S i es considera inactiva en reprimir la progressió del cicle.

La fosforilació de pRb és duta a terme per l'acció cooperativa dels diferents complexos ciclina/CDK actius a les fases G1 i S. Els primers complexos formats a la fase G1 després d'un estímul mitogènic són els complexos Ciclina D (D1, D2 i D3)/CDK(4 i 6) (Sherr, 1994), els quals estan implicats en la fosforilació de pRb (Dowdy et al., 1993). Les Ciclines D interaccionen directament amb pRb i acosten les CDKs al seu substrat (Strauss et al., 1995) essent considerades el factor que relaciona la senyalització depenent de factors de creixement amb la maquinària del cicle cel·lular (Lucas et al., 1995). A mesura que el cicle avança pel final de la fase G1 i inici de la fase S es formen de manera seqüencial els complexos Ciclina E/CDK2 i Ciclina A/CDK2 (Fang and Newport, 1991; Paris et al., 1991). Els complexos Ciclina (E i A)/CDK2 acaben de fosforilar pRb (Bartek et al., 1996) i permeten l'inici del procés replicatiu del DNA (Krude et al., 1997).

Les proteïnes relacionades amb pRb són proteïnes d'estructura i propietats bioquímiques similars a pRb com pRb2/p130 i p107 (Mayol et al., 1993; Paggi et al., 1996; Whyte, 1995). De la mateixa manera que ho fa pRb, p107 i pRb2/p130 interaccionen i inhibeixen l'activitat transcripcional de factors de transcripció de la família E2F/DP (Mayol and Grana, 1997). Altres proteïnes de

la família E2F/DP controlades per l'acció de les proteïnes relacionades amb pRb son E2F4 i E2F5 (Moberg et al., 1996). Les proteïnes relacionades amb pRb també son substrats potencials dels complexos ciclina/CDK de la fase G1 (Baldi et al., 1995; Claudio et al., 1996), però sembla ser que estan implicats en diferents vies de senyalització de les de pRb (Vairo et al., 1995).

Després de la fase G1 s'esdevé la fase S, fase marcada per l'inici de la replicació del DNA. Durant la fase S, el procés de replicació del DNA es desenvolupa de manera simultània a múltiples llocs d'un cromosoma i s'ha de coordinar amb l'activitat transcripcional per a possibilitar l'expressió dels gens necessaris per els passos següents del cicle i per les funcions vitals de la cèl·lula. A més, la replicació s'ha d'acompanyar de la duplicació de les proteïnes nuclears necessàries per a restaurar l'arquitectura cromosòmica que regula els patrons específics d'expressió gènica inherent a cada tipus cel·lular. Els complexos ciclina/CDK propis de la fase S son Ciclina A/CDK2 i Ciclina B/cdc2. Els complexos Ciclina A/CDK2 colocalitzen amb llocs de replicació del DNA (Cardoso et al., 1993) i possiblement, a més de contribuir a la fosforilació de pRb, tenen una funció en la formació, activació o manteniment dels complexos associats a la replicació del DNA. La següent fase després de la replicació del DNA és G2, una fase molt més curta on participen els complexos Ciclina B/cdc2 i en la qual diversos mecanismes reguladors asseguren la correcta replicació del genoma. Finalment en la fase M hi participen els complexos Ciclina (A i B)/cdc2 i la cèl·lula es divideix en dues cèl·lules filles idèntiques, les quals poden tornar a iniciar un nou cicle cel·lular.

El cicle cel·lular és, doncs, un procés complex i alhora essencial per a tot ésser viu, essent fonamental per a aquest que el procés es desenvolupi de manera correcta. Els mecanismes reguladors del cicle cel·lular són tots aquells processos necessaris per a garantir-ne l'adequat funcionament a tots els nivells. En aquest sentit l'estudi dels mecanismes reguladors del cicle cel·lular constitueix un capítol important en l'estudi del cicle cel·lular, en particular, i de la biologia, en general. Aquests mecanismes son múltiples i actuen a diferents nivells orquestrant

nombrosos processos de naturalesa molt diversa. Un important nivell de regulació el constitueix el grup de mecanismes que controlen l'activitat dels complexos ciclina/CDK, entre els quals hi ha les variacions dels nivells de ciclins, la regulació de la formació i ensamblatge dels complexos ciclina/CDK, l'acció de proteïnes inhibidores com els CKIs (*cyclin-kinase-inhibitors*) o la degradació proteosòmica. A més hi ha altres nivells de regulació que afecten els mecanismes esmentats. Per exemple, el proto-oncogen c-myc és induït per factors de creixement (Kelly and Siebenlist, 1986), regula l'activitat transcripcional de diversos gens entre els quals s'inclouen les ciclins (Bush et al., 1998; Xiao et al., 1998) i és un important regulador del cicle cel·lular i l'apoptosi (Dang, 1999; Henriksson and Luscher, 1996).

La degradació proteosòmica depenent d'ubiquïtina és un procés important en la regulació del cicle cel·lular. Aquest sistema requereix la unió covalent de la proteïna a degradar a la ubiquïtina com a pas previ per a la degradació de la proteïna per part del complex proteosòmic 26S. Les proteïnes del cicle cel·lular son degradades mitjançant dos sistemes de lligació a la ubiquïtina: (1) complexos PULC (*phosphoprotein-ubiquitin ligase complexes*), entre els quals hi ha els complexos SCF^{SKP2} (SKP1-CUL1-SKP2) (Lisztwan et al., 1998; Lyapina et al., 1998; Marti et al., 1999) i (2) complexos ciclosoama/APC (*anaphase promoting complex*) (King et al., 1995; Sudakin et al., 1995). Els complexos lligassa E3 de tipus PULC estan constitutivament actius i el procés de lligació depèn de la fosforilació del substrate a degradar; per exemple, les ciclins de la fase G1 son ubiquïtinitzades per aquest procés (Diehl et al., 1997; Won and Reed, 1996). En canvi, l'activitat del ciclosoama/APC és cicle cel·lular depenent i funciona al final de la mitosi ubiquïtinitzant, per exemple, les ciclins de la fase M (Hershko et al., 1994; Lahav-Baratz et al., 1995).

Els complexos de degradació propis de la fase S, fase objecte d'aquest estudi, son els complexos PULC. La ubiquïtinització és duta a terme mitjançant l'acció de tres enzims; E1 o activador de la ubiquïtina, E2 o portador de la ubiquïtina i E3 o lligassa de la ubiquïtina amb la proteïna a degradar. Normalment hi ha

un únic E1, diferents E2 i múltiples complexos multiproteics E3, essent aquests últims els responsables del reconeixement de la proteïna a degradar i, per tant, de l'especificitat del procés. El procés de degradació de les ciclines és un mecanisme regulador important perquè contribueix als canvis periòdics dels seus nivells durant les diferents fases del cicle (Deshaies et al., 1995; Glotzer et al., 1991; Luca et al., 1991; Seufert et al., 1995; Yaglom et al., 1995). A més de les ciclines, CDKs, inhibidors i altres proteïnes reguladores del cicle cel·lular també són degradades per processos dependents d'ubiquïtina. La degradació dels inhibidors CKIs al final de la fase G1 és essencial per a l'inici de la replicació del DNA (Ciechanover, 1994). Per exemple, el complex lligassa E3 SCF^{SKP2} (SKP1-CUL1-SKP2) ubiquïtinitza els inhibidors p27^{Kip1} (Carrano et al., 1999; Sutterluty et al., 1999) i p21^{Cip1} (Maki and Howley, 1997; Yu et al., 1998).

Altres processos reguladors que asseguren l'adequada progressió del cicle cel·lular són els *checkpoints*. El terme *checkpoint* ha estat definit com un procés bioquímic que assegura la dependència de dos altres processos que no estan relacionats entre ells. La presència de diversos *checkpoints* en les cèl·lules de mamífers permet aturar la progressió del cicle cel·lular en diferents moments i activar la via d'apoptosi o mort cel·lular programada si les condicions ho requereixen. El *checkpoint* del dany al DNA de la fase G1 relaciona la presència de DNA no lesionat amb la mitosi i està controlat per tres gens; p53 (Ko and Prives, 1996), p21^{Cip1} (Brugarolas et al., 1995; Deng et al., 1995) i el gen mutat en l'atàxia telangiectàsica (ATM) (Savitsky et al., 1995). Així, per exemple, el *checkpoint* de dany al DNA és el mecanisme que permet detectar DNA danyat i genera senyals que aturen les cèl·lules en fase G1, enlenteixen la fase S, aturen les cèl·lules en fase G2 i indueixen la transcripció de gens reparadors. El *checkpoint* de la fase S relaciona l'inici de la mitosi amb l'acompliment de la replicació del DNA. En aquest *checkpoint* la presència de defectes en la formació del fus mitòtic activa una via de senyalització intracel·lular que bloqueja l'inici de l'anafase i estabilitza els subestrats de l'APC (Elledge, 1996).

El model vigent de regulació de les fases G1 i S permet considerar els diferents

reguladors com elements clau en la transformació cel·lular i els processos tumorals, consideració que s'ha confirmat en nombrosos estudis experimentals i clínics. Els reguladors positius com ciclines i CDKs són considerats promotors tumorals o proteïnes possiblement implicades en la generació de tumors. En canvi, els reguladors negatius com CKIs o el mateix pRb poden considerar-se com a supressors tumorals. Les primeres evidències relacionant el cicle cel·lular amb la transformació oncogènica sorgiren amb l'observació que les oncoproteïnes E1A d'adenovirus actuen sobre el complexe Ciclina A/CDK2 (Giordano et al., 1991; Giordano et al., 1989; Pines and Hunter, 1990; Tsai et al., 1991a) i sobre altres proteïnes com pRb, pRb2/p130 i p107 (Moran, 1993). Estudis en ratolins han relacionat la sobreexpressió de Ciclina D1 en glàndules mamàries amb carcinoma (Wang et al., 1994), el dèficit de l'inhibidor de les Ciclines D, p16^{INK4}, amb tumorigènesi (Serrano et al., 1996) o l'inhibidor p27^{Kip1} amb la supressió del càncer de pròstata (Di Cristofano et al., 2001). Diversos estudis clínics confirmen també l'important paper dels mecanismes reguladors del cicle cel·lular en el desenvolupament neoplàssic i permeten inferir la possible utilitat d'aquests mecanismes en el diagnòstic, pronòstic i tractament d'aquestes patologies. Per exemple, recents estudis atribueixen valor pronòstic a la sobreexpressió de Ciclina D1 en les metàstasis òssies del càncer de pròstata (Drobnjak et al., 2000) i en el sarcoma retroperitoneal (Kim et al., 2001).

3. Complexes ciclina/CDK. Estructura, funció i regulació

Els complexos ciclina/CDK son elements essencials en la progressió del cicle cel·lular i de menció obligada en qualsevol estudi d'aquesta temàtica. La formació i activació seqüencials de diferents complexos ciclina/CDK actuen controlant la progressió de les cèl·lules eucariotes per les successives fases del cicle cel·lular, tal i com s'ha revisat a la literatura (Nigg, 1995; Sherr, 1993; Sherr, 1995). Els complexos ciclina/CDK estan formats per una subunitat catalítica, una quinassa de la família de les CDKs, i una subunitat reguladora, una proteïna de la família de les ciclines.

Les CDKs (*cyclin-dependent protein kinases*) (Assoian, 1997; Morgan, 1997) formen una família de serín/treonín quinasses relacionades estructuralment que tenen com a principal característica la seva necessitat d'associar-se a una altra família de proteïnes -les ciclins- per a la seva activitat. Les CDKs son una família de proteïnes molt homòlogues (40 a 75% de similitud entre CDK1 a CDK7) que contenen una zona catalítica comú conservada d'uns 300 aminoàcids i una estructura terciària comú evidenciada en estudis cristal·logràfics. Estudis més detallats, però, mostren diferències en els llocs catalítics de les diferents CDKs, fet que suggereix l'existència de diferents mecanismes de regulació entre les diverses quinasses.

Les ciclins son una família de proteïnes considerablement diversa amb un pes molecular de 30KD a 90KD, relacionades estructuralment i caracteritzades per la seva unió i activació de la part catalítica de la CDK. El nom d'aquesta família de proteïnes ve donat pel seu patró d'expressió oscil·latori amb augments característics de determinades ciclins en fases específiques del cicle cel·lular. La homologia entre les ciclins es manifesta per l'existència de l'anomenat *cyclin box*, un domini conservat d'uns 100 aminoàcids responsable de la unió i activació de la CDK. Així, les ciclins i les CDKs formen complexos; hi ha complexos propis de cada fase, integrats per una parella de ciclina i CDK concrets dels quals depèn la progressió del cicle durant aquella fase. Cada CDK interacciona amb una o més ciclins però no totes les ciclins interaccionen amb totes les CDKs.. L'especificitat del complexos ciclina/CDK per dur a terme aquest gran nombre de funcions és possible perquè les cèl·lules eucariotes tenen una gran varietat de ciclins i de CDKs funcionalment diferents i que actuen de manera específica a cada fase del cicle.

Les CDKs formen una família versàtil i amb funcions molt diverses relacionades o no amb el control del cicle cel·lular. Les funcions dels complexos ciclina/CDK relacionades amb el cicle cel·lular fan referència a la seva activitat quinassa sobre diferents molècules efectores del cicle duta a terme per diferents complexos en cada una de les fases del mateix. Així doncs, els complexos Ciclina D (D1, D2, D3)/CDK (4 i 6) estan implicats en la progressió de les cèl·lules per la fase G1 i en

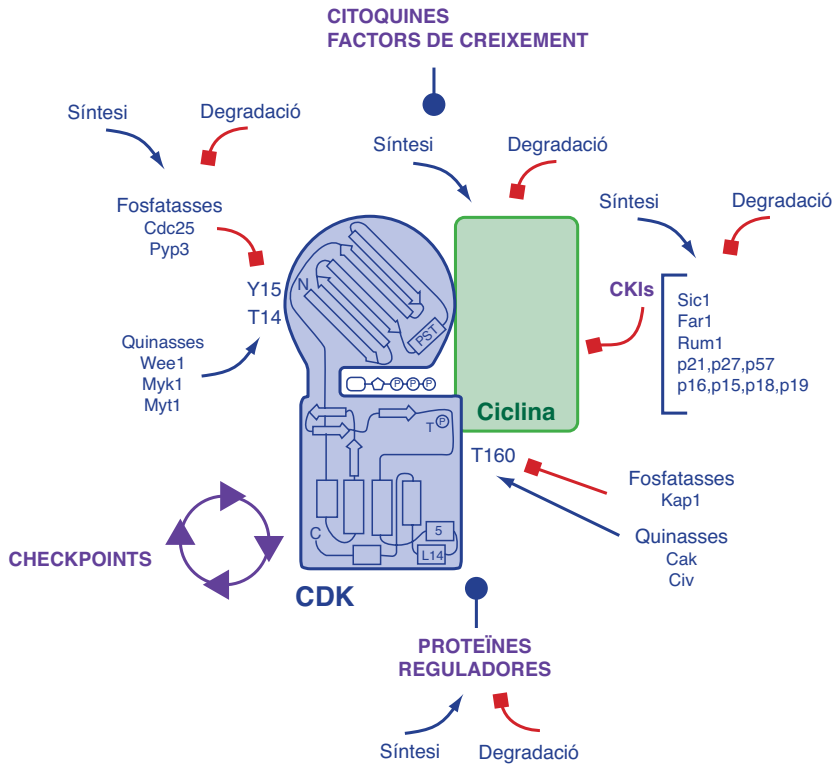


Figura 2. Nivells de regulació dels complexos ciclina/CDK. El dibuix mostra de manera esquemàtica alguns dels múltiples nivells de regulació que afecten l'activitat dels complexos ciclina/CDK. L'activitat enzimàtica seqüencial de les diverses CDKs està estrictament regulada a nivell d'interaccions proteiques amb, per exemple, ciclins i proteïnes inhibidores. Altres factors reguladors els constitueixen els múltiples mecanismes de fosforilació/desfosforilació que afecten tant a les CDKs com a les altres proteïnes amb les quals s'associa. A més, tant els patrons programats de síntesi i degradació de les molècules implicades com la seva localització subcel·lular asseguren la seva disponibilitat en moments concrets, contribuint així a un esdevenir correcte i ordenat. Els mecanismes esmentats estan sotmesos a l'acció de diverses vies de senyalització intracel·lulars que reflexen l'acció de factors de creixement extracel·lulars o hormones i permeten integrar la maquinària de divisió cel·lular en el context del teixit i organisme del qual formen part. Finalment s'ha d'afegir l'acció dels *checkpoints* o mecanismes de control del cicle cel·lular originats en la mateixa cèl·lula per a coordinar diferents processos en l'espai i en el temps en resposta a irregularitats en la progressió del cicle.

el pas a la fase S (Baldin et al., 1993; Quelle et al., 1993). Els complexos Ciclina (E i A)/CDK2 estan implicats en l'entrada i progressió de les cèl·lules per la fase S. Els nivells de Ciclina E augmenten al principi de la fase S (Dulic et al., 1992; Koff et al., 1992) i els nivells de Ciclina A augmenten durant les fases S i G2 (Pines and Hunter, 1990; Tsai et al., 1991b). Finalment, els complexos Ciclina (A,B)/cdc2 controlen l'entrada i sortida de la fase M (Norbury and Nurse, 1992).

Els complexos ciclina/CDK estan sotmesos a molts nivells de regulació: la CDK no pot activar-se sense la unió de la ciclina, l'activitat dels complexos ciclina/CDK està regulada positiva i negativament mitjançant fosforilacions i desfosforilacions i la unió tant d'inhibidors (CKIs) com d'altres proteïnes reguladores modulen l'activitat quinassa. A més, l'acció de ciclins, CDKs, inhibidors i altres proteïnes reguladores està controlada a nivell de transcripció, síntesi, localització subcel·lular i proteòlisi depenent d'ubiquïtina establint-se, sovint, *feedbacks* on la mateixa CDK actua regulant una o més d'aquestes proteïnes. Finalment, cadascun dels mecanismes que afecta l'activitat dels complexos ciclina/CDK està també afectat per vies de transducció de senyals intracel·lulars que permeten la regulació del cicle cel·lular a través de factors extracel·lulars.

Un dels mecanismes reguladors importants de l'activitat dels complexos ciclina/CDK és l'acció moduladora exercida per la unió de diverses proteïnes anomenades clàssicament inhibidores. Els CKIs (*cyclin-kinase inhibitors*) poden classificar-se en dos tipus segons similitud de seqüència i especificitat d'acció. La família Cip-Kip o inhibidors universals actuen sobre totes les quinasses de la fase G1-S i inclouen p21^{Cip1} (Dulic et al., 1994; el-Deiry et al., 1993; Gu et al., 1993; Harper et al., 1993; Noda et al., 1994; Xiong et al., 1993a), p27^{Kip1} (Polyak et al., 1994a; Polyak et al., 1994b; Toyoshima and Hunter, 1994) i p57^{Kip2} (Lee et al., 1995; Matsuoka et al., 1995). La família INK4 o inhibidors específics exerceixen la seva acció inhibidora exclusivament sobre CDK4 i CDK6 i inclouen p16^{INK4a} (Serrano et al., 1993), p15^{INK4b} (Hannon and Beach, 1994), p18^{INK4c} (Guan et al., 1994; Hirai et al., 1995) i p19^{INK4d} (Chan et al., 1995; Hirai et al., 1995).

Les proteïnes CKIs de la família Cip-Kip s'han considerat clàssicament com a

reguladors negatius de la progressió del cicle cel·lular perquè inhibeixen l'activitat catalítica dels complexos ciclina/CDK (Sherr and Roberts, 1995) mitjançant la seva unió directa a la ciclina i la CDK (Chen et al., 1995; Chen et al., 1996; Lim et al., 1996; Nakanishi et al., 1995; Russo et al., 1996a; Warbrick et al., 1995). Actualment s'ha ampliat la visió clàssica i es considera que alguns inhibidors com p21^{Cip1} i p27^{Kip1} són necessaris per alguns processos que regulen positivament la progressió del cicle cel·lular. Concretament s'ha descrit que p21^{Cip1} i p27^{Kip1} són necessaris per a l'ensamblatge, l'estabilitat i la localització nuclear dels complexos Ciclines D/CDK (4 i 6) (Cheng et al., 1999). A més, s'ha proposat també que l'acció inhibidora dels CKIs sobre els complexos ciclina/CDK pot ser recíproca mitjançant l'actuació dels CKIs com a substrats dels complexos ciclina/CDK. Així, per exemple, evidències experimentals mostren que el complexe Ciclina E/CDK2 pot fosforilar p27^{Kip1} i que aquesta fosforilació té com a resultat l'eliminació de p27^{Kip1} i, per tant, la progressió de les cèl·lules de la fase G1 a la fase S (Sheaff et al., 1997).

4. Complexes Ciclina A/CDK2. Estructura

El present treball s'ha centrat en l'estudi de la proteïna reguladora p45^{SKP2}, la qual va ser inicialment descrita com a integrant dels complexos Ciclina A/CDK2 actius de la fase S (Zhang et al., 1995). CDK2 s'associa amb Ciclina E i amb Ciclina A i els complexos resultants són claus en el pas de la cèl·lula de G1 a S i en la progressió per la fase S.

CDK2 és, com els altres membres de la família CDK, una serín/treonín quinassa i s'estructura en un lòbul amino-terminal (aminoàcids 1 a 85) ric en plegaments β i un lòbul més gran carboxi-terminal (aminoàcids 85 a 897) α -helicoidal. En el lòbul amino-terminal hi ha també una zona α -helicoidal que conté la seqüència PSTAIRE, motiu característic de la família CDK, ja que és el que permet la seva unió amb les ciclines. Entre els dos lòbuls hi ha la zona que conté els residus catalítics conservats entre totes les protein-quinasses eucariotes i on

s'uneix l'ATP. Es considera que en aquesta zona hi ha la unió del substracte i hi té lloc la catàlisi. Una part de l'extrem carboxi-terminal de CDK2 forma una estructura anomenada *loop T*, localitzada prop del lloc d'unió del substracte i important per a la regulació de l'activitat de la quinassa (De Bondt et al., 1993; Jeffrey et al., 1995).

La molècula de Ciclina A té una estructura globular consistent en 12 α -hèlics i conté la zona *cyclin-box* (aminoàcids 209 a 310), una seqüència conservada caracteritzada per la seva unió al motiu PSTAIRE de CDK2 (Kobayashi et al., 1992; Lees and Harlow, 1993). La Ciclina A s'uneix a un costat de la fenedura catalítica de CDK2 interaccionant amb els dos lòbuls de la quinassa i formant una gran interfase proteïna-proteïna. La zona *cyclin-box* de la Ciclina A interacciona amb el motiu PSTAIRE de CDK2 alhora que forma contactes amb el *loop T* i les làmines β amino-terminals de la quinassa. D'aquesta manera la unió de la Ciclina A a CDK2 indueix canvis conformacionals i posicionals; la unió de Ciclina A altera la conformació de la regió PSTAIRE i del *loop T* de CDK2 i canvia la orientació relativa dels lòbuls amino- i carboxi-terminals de la quinassa (Brown et al., 1995; Jeffrey et al., 1995).

Estructuralment, els complexos Ciclina A/CDK2 formen part de multicomplexes proteics la composició dels quals varia segons el moment del cicle i l'activitat cel·lular. Les proteïnes associades als complexos Ciclina A/CDK2 inclouen p21^{Cip1} i p27^{Kip1} (Harper et al., 1993; Toyoshima and Hunter, 1994; Zhang et al., 1993), PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) (Zhan et al., 1993), p107 (Ewen et al., 1992; Faha et al., 1992), CksHs1/2 (Richardson et al., 1990; Zhang et al., 1995), el factor de transcripció E2F-1 (Dymlacht et al., 1994; Krek et al., 1994), p19^{SKP1} i p45^{SKP2} (Zhang et al., 1995).

5. Complexes Ciclina A/CDK2. Funció

CDK2 forma complexos amb Ciclina E i Ciclina A en diferents moments del

cicle cel·lular; així es formen els complexos Ciclina E/CDK2 en la fase G1-S i els complexos Ciclina A/CDK2 en la fase S. Els complexos ciclina/CDK2 actuen com a quinasses i entre els seus substrats s'inclouen diverses proteïnes possiblement implicades en la replicació i transcripció del DNA o en el processament del RNA. Així, està àmpliament descrit que els complexos Ciclina (E,A)/CDK2 promouen l'expressió dels gens necessaris per l'entrada i progressió de la fase S mitjançant la fosforilació de pRb (Hinds et al., 1992; Resnitzky et al., 1995). Altres substrats del complexo Ciclina A/CDK2 inclouen p107 (Peeper et al., 1993), proteïna A de replicació (Nigg, 1993), E2F (Dymlacht et al., 1994) o p21^{Cip1} (Jaumot et al., 1997), però hi ha evidències experimentals de l'existència de més substrats putatius de CDK2 (Jaumot et al., 1996). Altres dades experimentals mostren també que tant Ciclina E com Ciclina A es troben associades als complexos E2F units al DNA durant el final de la fase G1 i S, respectivament (Bandara et al., 1991; Lees et al., 1992; Mudryj et al., 1991); d'aquesta manera, la Ciclina A associada amb els complexos E2F/DNA permet el reclutament de CDK2 per a fosforilar les proteïnes pRb o p107 unides a E2F (Bandara et al., 1992; Cao et al., 1992; Devoto et al., 1992).

Per tant, l'activitat dels complexos Ciclina A/CDK2 és crítica per a l'entrada de les cèl·lules en fase S i s'ha demostrat que la inhibició de la funció de la Ciclina A evita l'entrada de les cèl·lules en l'esmentada fase (Girard et al., 1991; Pagano et al., 1992; Zindy et al., 1992). A més, però, els complexos Ciclina A/CDK2 també semblen estar implicats en la supressió de l'expressió gènica al final de la fase S. Dades experimentals mostren que els complexos Ciclina A/CDK2 s'uneixen als complexos E2F/DP-1/DNA i fosforilen DP-1. Aquesta fosforilació causa l'alliberament dels complexos E2F/DP-1 del DNA i la inhibició de l'expressió gènica dependent de E2F/DP-1 (Krek et al., 1994). Alguns autors proposen que aquesta dualitat funcional dels complexos Ciclina A/CDK2 podria estar facilitada per els canvis periòdics en els nivells de Ciclina A. Així, els baixos nivells de Ciclina A a l'inici de la fase S promourien la fosforilació de pRb, l'expressió de gènica i la progressió de la fase S; en canvi, els nivells alts de Ciclina A al final de la fase S

promourien la fosforilació de la subunitat DP-1 i suprimirien l'expressió gènica afavorint la sortida de la fase S.

Com ja s'ha vist anteriorment, el nom de complexos ciclina/CDK2 s'utilitza com a terme genèric que fa referència, no només a la unió de la ciclina amb la quinassa, sinó a complexos multiproteics considerats com a unitats estructurals però integrats per diverses proteïnes. En alguns casos es coneix que aquesta unitat estructural es correspon amb una unitat funcional; per exemple, s'ha descrit que en els complexos Ciclina A/CDK2/p21^{Cip1}/PCNA la CDK2 és inactiva (Zhang et al., 1993) i que en els complexos Ciclina A/CDK2/p45^{SKP2}/p19^{SKP1} la CDK2 és activa (Xiong et al., 1993b). A més, es creu que cadascun dels integrants dels complexos pot tenir una funció individual, per exemple, modulant l'activitat quinassa de CDK2, afectant la vida mitja dels integrants dels complexos o actuant com a substrat de la quinassa i com a proteïna efectora. En molts casos, però, aquestes funcions individuals no s'han determinat i la significància funcional de la interacció d'aquestes proteïnes amb els complexos Ciclina A/CDK2 en el context del cicle cel·lular es desconeix.

6. Complexos Ciclina A/CDK2. Regulació

CDK2 té un core catalític d'uns 300 aminoàcids que és completament inactiu quan està sol i no fosforilat. Això és així per dues coses; en primer lloc, el lloc d'unió al substrat està bloquejat per una part de l'extrem carboxi-terminal de l'enzim anomenat *loop T* i, en segon lloc, les cadenes laterals del lloc d'unió a l'ATP posicionen de tal manera els fosfats de l'ATP que fan molt difícil la fosfotransferència (De Bondt et al., 1993; Morgan and De Bondt, 1994). L'activitat de CDK2 està controlada per mecanismes bioquímics molt conservats que formen part d'una complexa xarxa de mecanismes reguladors que actuen a diversos nivells.

El regulador primari de l'activitat CDK2 és la Ciclina A, la qual confereix acti-

vitat quinassa basal al complexe Ciclina A/CDK2 (Connell-Crowley et al., 1993). La unió de la Ciclina A induïx canvis conformacionals i posicionals a CDK2 que van ser evidenciats amb la cristal·lització del complexe Ciclina A/CDK2 (Jeffrey et al., 1995). En primer lloc, la interacció de la *cyclin box* de la ciclina amb la regió PSTAIRE de CDK2 causa la reorientació de la regió PSTAIRE que converteix a l'ATP en accessible. En segon lloc, la unió de la ciclina a *loop T* causa el desplaçament d'aquest *loop* i així es desbloqueja el lloc d'unió del substrat. En tercer lloc, la interacció permet exposar el residu Thr -160 del *loop T*, el qual és un altre dels mecanismes d'activació de CDK2. Per últim, es pensa que la unió de la ciclina a la CDK també pot promoure l'activitat cap a substrats específics o localitzacions subcel·lulars determinades (Dynlacht et al., 1994; Peeper et al., 1993; Pines, 1994).

L'activació completa de CDK2 requereix, a més de la unió de la ciclina, la fosforilació d'un residu conservat de treonina situat al *loop T* de CDK2, a la posició 160 (De Bondt et al., 1993; Fisher and Morgan, 1994; Morgan and De Bondt, 1994; Russo et al., 1996b) . La fosforilació afecta al *loop T* i fa més accessible el lloc d'unió del substrat, activant totalment al complexe ciclina/CDK. Actualment es considera que la unió de Ciclina A a CDK2 afavoreix la fosforilació activadora de la quinassa i que alhora aquesta fosforilació actua estabilitzant el complexe ciclina/CDK (Desai et al., 1995; Ducommun et al., 1991). L'enzim responsable de la fosforilació de la Thr-160 és CAK (*CDK-activating kinase*), un complexe enzimàtic format per CDK7, Ciclina H i una tercera proteïna anomenada MAT1 (*menage-à-trois 1*) (Fisher and Morgan, 1994; Makela et al., 1994; Poon et al., 1993; Solomon et al., 1993; Tassan et al., 1994). CDK7 conté, com els seus substrats, un lloc de fosforilació potencial situat a la posició Thr-170 que regula la seva activitat quinassa. L'activitat de l'enzim CAK és constant durant totes les fases del cicle però, malgrat això, la fosforilació de la Thr-160 no és constant, sinó que és paral·lela a la unió de la ciclina a la CDK, fet que reflecteix l'efecte estimulador que té en la fosforilació de la CDK la unió de la ciclina (Brown et al., 1994; Gu et al., 1992; Krek and Nigg, 1991; Matsuoka et al., 1994). A més de la fosforilació de les CDKs, CDK7 complexat amb Ciclina H

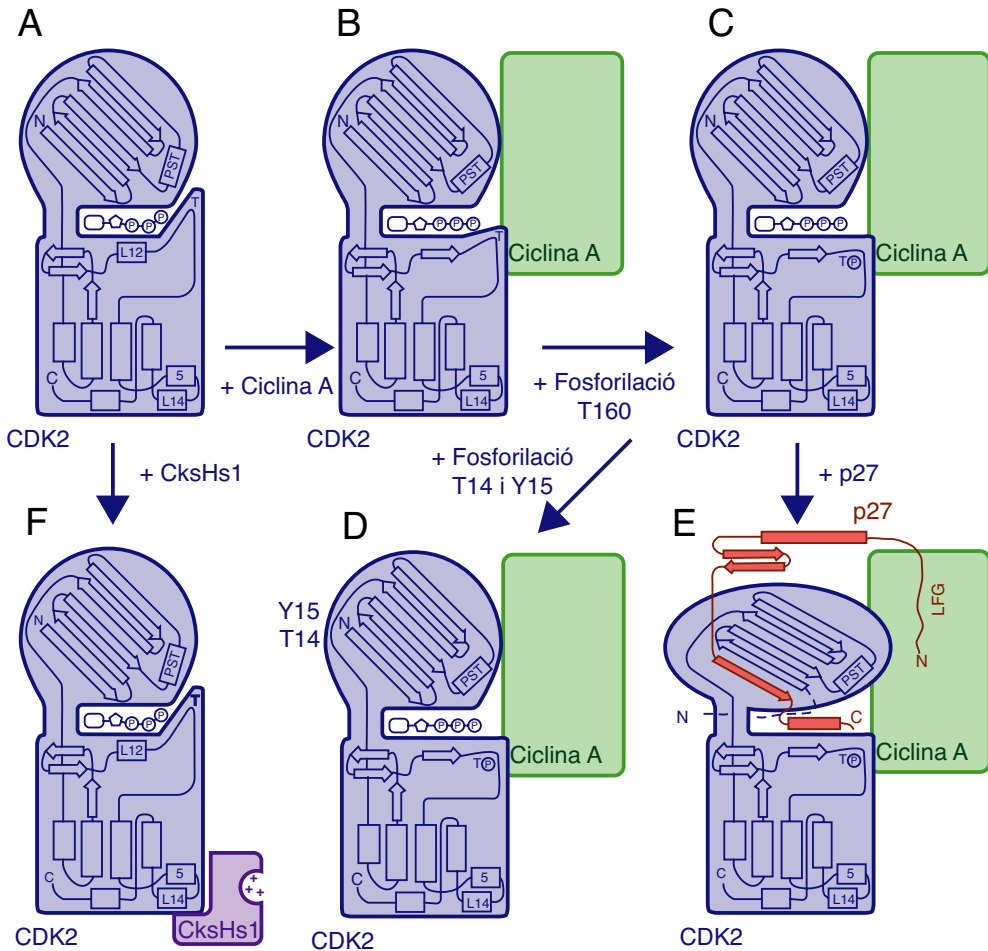
participa en la transcripció fosforilant la RNA polimerasa II. D'aquesta manera s'estableix una relació entre l'activitat transcripcional i l'activitat dels complexos ciclina/CDK, és a dir, el control del cicle cel·lular. Aquest fet il·lustra la complexitat i interrelació existent entre els mecanismes reguladors del cicle cel·lular.

L'eliminació de la ciclina o la desfosforilació de la Thr-160 inhibeix l'activitat de CDK2. Un altre mecanisme d'inhibició de la CDK és la fosforilació de la Thr-14 i la Tyr-15, un mecanisme especialment important en el cas de *cdc2* però també present en el cas de CDK2 i d'altres CDKs (Krek and Nigg, 1991; Norbury et al., 1991). Aquests dos residus estan situats al lloc d'unió de l'ATP i, fosforilats, obstaculitzen directament la fosfotransferència. Així mateix, la desfosforilació d'aquests residus constitueix un mecanisme d'activació de la CDK (Lew and Kornbluth, 1996). Wee 1 és l'enzim responsable de la fosforilació de la Tyr-15 i la seva activitat disminueix durant la mitosi causant l'eliminació de la fosforilació inhibidòria de CDK1. L'activitat de Wee 1 és controlada per fosforilacions, però les quinasses estan poc clares. CDC25 és una fosfatasa dual responsable de la desfosforilació de la Thr-14 i la Tyr-15, la seva activitat augmenta durant la mitosi i també és controlada per fosforilacions-desfosforilacions. L'intrincat mecanisme regulador d'aquestes fosforilacions és poc clar, però sembla que

Figura 3. Mecanismes reguladors de CDK2. (A) El CDK2 monomèric és inactiu en absència de la unió de ciclina. (B) La unió de la Ciclina A a la regió PSTAIRE i al *loop T* de CDK2 causa canvis conformacionals en aquestes zones que faciliten la unió del substracte i la fosforilació de la Thr-160. (C) La fosforilació de la Thr-160 causa l'activació completa del complexe i afavoreix la seva estabilitat. (D) A més, la fosforilació de la Thr-14 i la Tyr-15 inhibeix l'activitat de la CDK i alhora la seva desfosforilació actua com a mecanisme activador de la quinassa. (E) La unió de proteïnes inhibidores de la família Cip/Kip com p21^{Cip1} o p27^{Kip1} bloqueja el lloc catalític de CDK2 i inhibeix la seva activitat. (F) El complexe Ciclina A/CDK2 interacciona amb altres proteïnes com, per exemple, p45^{SKP2} o CksHs1 però la funció d'aquestes associacions en la regulació del complexe Ciclina A/CDK2 no ha estat fins ara determinada. Aquests mecanismes bioquímics són controlats per activitats enzimàtiques regulades a la vegada per altres enzims i per processos de síntesi i degradació, els mateixos que afecten a la ciclina, als inhibidors i a altres proteïnes reguladores. Tot plegat és el resultat de l'acció coordinada d'un conjunt molt gran de mecanismes que responen a diversos senyals intra i extracel·lulars.

pot haver *feedbacks* positius per part de la mateixa CDK; per exemple, estimulació de la quinassa que inactiva Wee 1 i inhibició de la fosfatasa que inhibeix CDC25 i activa Wee 1.

Un altre mecanisme de regulació de l'activitat de CDK2 és l'exercit per l'acció de diverses proteïnes inhibidores de les CDKs (CKIs), les quals actuen just després de l'acció de les quinasses essent així un mecanisme molt eficient de regulació de



l'activació seqüencial de complexos ciclina/CDKs específics durant la progressió del cicle cel·lular. Els CKIs de la família Cip/Kip s'uneixen als complexos Ciclina A/CDK2 i inhibeixen la seva activitat quinassa per un mecanisme directe poc conegut. L'estructura cristal·lina del complexe Ciclina A/CDK2/p27^{Kip1} (Russo et al., 1996a) mostra que el pèptid p27^{Kip1} s'uneix tant a la Ciclina A com a CDK2 causant canvis en la conformació activa de la quinassa i inhibint així de manera directa la seva activitat.

Tal com s'ha comentat, hi ha altres proteïnes que formen part dels complexos Ciclina A/CDK2 però que no s'han implicat fins ara en cap funció en aquests complexos que justifiqui la seva localització. Així, algunes d'aquestes proteïnes podrien, tal i com fan els CKIs, exercir una funció moduladora de l'activitat quinassa de CDK2 i un paper regulador en la progressió del cicle cel·lular. Dues de les proteïnes que formen part dels complexos Ciclina A/CDK2 però que hi tenen una funció desconeguda són CksHs1 i p45^{SKP2}. Ambdues proteïnes tenen un paper central en el nostre estudi i, per això, són tractades de manera individual en els apartats següents.

7. p45^{SKP2}. Proteïna integrant dels complexos Ciclina A/CDK2

p45^{SKP2} és una proteïna reguladora del cicle cel·lular anomenada SKP2 (*S phase kinase-associated protein 2*) perquè va ser descrita per la seva associació a la quinassa de fase S CDK2 (Zhang et al., 1995). L'estructura de p45^{SKP2} consisteix en una part amino-terminal on hi ha un domini F-box i una part carboxi-terminal que presenta diverses repeticions riques en leucines. El domini F-box està estructurat en tres hèlixs i està implicat en la interacció de p45^{SKP2} amb p19^{SKP1} i amb la formació del complexe SCF^{SKP2}. A continuació del domini F-box hi ha un únic domini estructural format per deu repeticions riques en leucines, cadascuna d'elles integrada per una α -hèlix i un plegament β . Els dominis rics en leucines estan clàssicament implicats en interaccions proteïna-proteïna (Kobe and Dei-

senhofer, 1995; Schulman et al., 2000).

Les proteïnes F-box son membres d'una gran família de proteïnes que regulen processos com el cicle cel·lular o la resposta immune i diverses cascades de senyalització dirigint altres proteïnes cap a la via d'ubiquitinització i degradació per part del proteosoma (Cenciarelli et al., 1999; Elledge and Harper, 1998; Hershko and Ciechanover, 1998; Winston et al., 1999). Les proteïnes F-box formen part dels complexos SCF o complexos protein-lligassa de la ubiquitina E3, integrats per p19^{SKP1}, CUL1 i Rbx/ROC1 com a components invariables i una proteïna F-box com a component variable. En el complexe SCF, la funció de les proteïnes F-box és la de permetre el reconeixement del substracte de manera específica. Aquestes proteïnes s'uneixen al core catalític constant de SCF a través del seu motiu invariable F-box que interacciona amb SKP1, i s'uneixen de manera específica al substracte fosforilat mitjançant els seus dominis variables rics en leucina que permeten interaccions proteïna-proteïna. El gran nombre de proteïnes F-box permet la ubiquitinació de nombrosos i diversos substractes (Bai et al., 1996; Skowyra et al., 1997).

p45^{SKP2} forma part del complexe SCF^{SKP2}, complexe que funciona com a principal lligassa de la ubiquitina controlant l'abundància de diverses proteïnes implicades en la regulació del cicle cel·lular (Deshaies, 1999; Koepp et al., 1999; Krek, 1998; Lisztwan et al., 1998; Lyapina et al., 1998; Patton et al., 1998; Yu et al., 1998). Com a proteïna F-box, p45^{SKP2} s'uneix al complexe lligassa de la ubiquitina SCF mitjançant la seva interacció amb p19^{SKP1} (Bai et al., 1996). La presentació de l'estructura cristal·lina del complexe p19^{SKP1}/p45^{SKP2} ha mostrat el mecanisme d'unió del domini F-box al complexe SCF (Schulman et al., 2000). Les dades experimentals mostren que el complexe SCF^{SKP2} promou la ubiquitinització i degradació dels següents reguladors i efectors del cicle cel·lular: p21^{Cip1} i Ciclines D (Maki and Howley, 1997; Yu et al., 1998), E2F-1 (Marti et al., 1999), p27^{Kip1} (Carrano et al., 1999; Sutterluty et al., 1999; Tsvetkov et al., 1999), B-myb (Charrasse et al., 2000) i Ciclina E (Yeh et al., 2001).

Els nivells de la proteïna SKP2 canvien significativament durant la progressió

del cicle cel·lular, augmentant des de la fase G1-S, acumulant-se durant la fase S i disminuint cap a la fase M (Lisztwan et al., 1998; Michel and Xiong, 1998; Vigorito, 1999). En aquest sentit, s'ha hipotetitzat que el principal determinant de la periodicitat de SKP2 durant G0-S seria el component dels complexos SCF

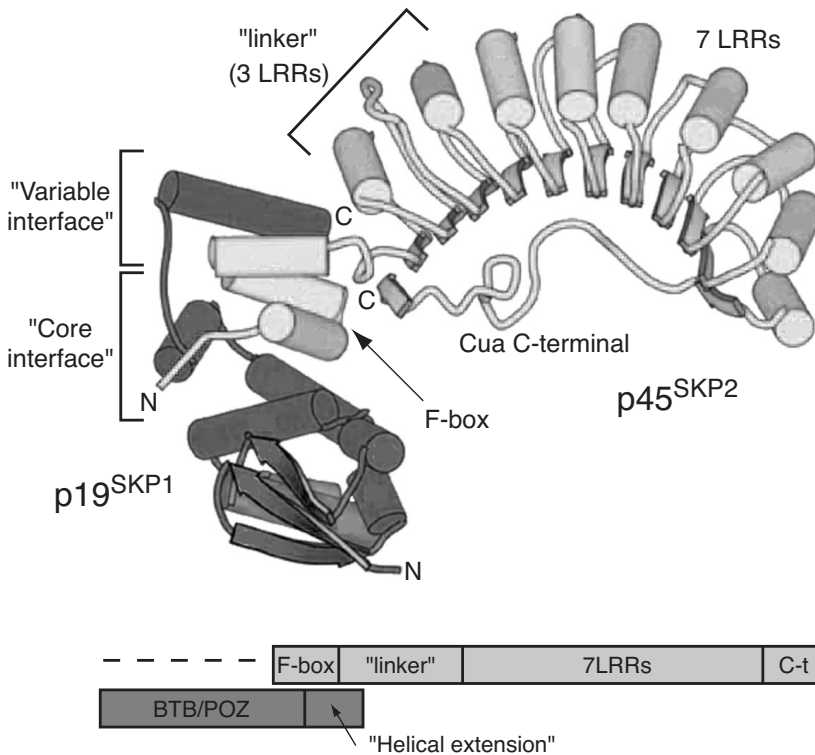


Figura 4. Estructura del complexe p45^{SKP2}/p19^{SKP1} (Schulman et al., 2000). p45^{SKP2} s'estructura en un domini F-box situat amino-terminal i format per tres hèlixs (H1 a H3) i una part carboxi-terminal formada per deu repeticions riques en leucines (H4 a H12). L'estructura del complexe p45^{SKP2}/p19^{SKP1} té forma de falç on SKP1 i el motiu F-box de SKP2 representen el mànec i el domini ric en leucines de SKP2 representa la part corba. El lloc d'unió SKP1-SKP2 és una extensa interfase on hi ha implicats els dominis amino-terminal i carboxi-terminal de SKP1 i el domini F-box de SKP2.

CUL1, el qual regularia l'estabilitat de SKP2 mediant la degradació de la proteïna (Wirbelauer et al., 2000). A més, altres evidències experimentals mostren que els nivells de p45^{SKP2} augmenten en cèl·lules transformades i que, funcionalment, el bloqueig de l'acció de p45^{SKP2} comporta una aturada en fase S (Zhang et al., 1995). Tot plegat fa que p45^{SKP2} es consideri imprescindible pel pas de la fase G1 a la fase S.

Estructuralment p45^{SKP2} forma part dels complexos SCF^{SKP2} i dels complexos actius de la fase S Ciclina A/CDK2 però clàssicament la seva funció reguladora en la progressió del cycle cel·lular s'ha relacionat només amb la seva participació en els complexos SCF^{SKP2} i en la degradació de molècules reguladores o efectores. Ara bé, a part del seu paper en la ubiquitinació, p45^{SKP2} està adquirint una importància creixent com a regulador de l'activitat quinassa dels complexos de CDK2. Recents experiments mostren que p45^{SKP2} promou la acumulació de Ciclina A (Sutterluty et al., 1999) i que, mitjançant els seus dominis amino-terminal i carboxi-terminal, interacciona amb el complexe Ciclina A/CDK2 i afecta l'activitat quinassa de CDK2 (Sutterluty et al., 1999; Yam et al., 1999). Aquests experiments mostren a vegades dades contradictòries, ja que s'ha descrit alhora que p45^{SKP2} exerceix una funció activadora sobre CDK2 i afavoreix la inducció i progressió de la fase S (Sutterluty et al., 1999) o que exerceix una funció inhibidora i causa detenció en G1/S (Yam et al., 1999).

8. CksHs1. Proteïna integrant dels complexos Ciclina A/CDK2

CksHs1 és una proteïna petita d'uns 9KD que forma part de la família de proteïnes reguladores del cycle cel·lular Cks (9-18 KD). Aquestes proteïnes són un grup de proteïnes conservades filogenèticament a nivell estructural i funcional que desenvolupen funcions essencials en el cycle cel·lular. La primera Cks descrita va ser el gen *suc1* (*supressor of cdc2 temperature-sensitive mutations*) que codifica per la proteïna p13^{suc1} de *Schizosaccharomyces pombe* i interacciona amb la quinassa p34^{cdk2} (Hayles et al., 1986; Hindley et al., 1987). L'homòleg en

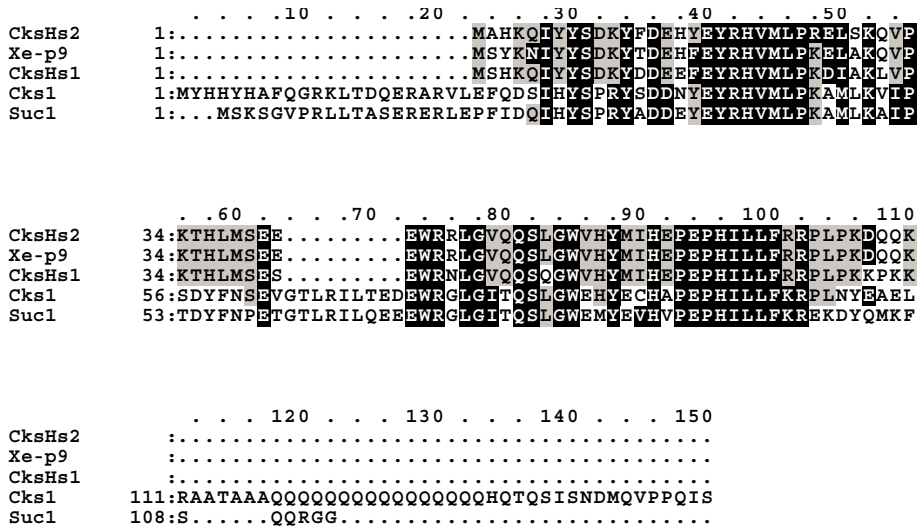


Figura 5. Comparació de les seqüències dels diferents membres de la família de proteïnes Cks. Es mostren les seqüències aliniades dels dos homòlegs de llevat (Suc1 i Cks1), juntament amb les dues formes humanes (CksHs1 i CksHs2) i l'homòleg en *Xenopus* (Xe-p9). La comparació de les seqüències mostra l'elevat grau d'homologia entre les diferents formes de la família de proteïnes Cks.

Saccharomyces cerevisiae es va anomenar Cks1 (*Cdc28 kinase subunit 1*) per la seva interacció amb Cdc28, la CDK en aquests llevats (Hadwiger et al., 1989). Xe-p9 és l'homòleg de les proteïnes Suc1/Cks1 en *Xenopus* (Patra and Dunphy, 1996) i p12^{cks1} és la forma present en *Leishmania mexicana* (Mottram and Grant, 1996). Les proteïnes Cks s'uneixen a la CDK mitòtica a llevats (Brizuela et al., 1987), cèl·lules humanes (Draetta et al., 1987) i ous de *Xenopus* (Patra and Dunphy, 1996). Les cèl·lules humanes contenen dues isoformes de proteïnes Cks, p9^{CksHs1} i p9^{CksHs2}, ambdues descrites per la seva interacció amb CDK2 (Richardson et al., 1990).

La determinació de l'estructura cristal·lina de CksHs1 (Arvai et al., 1995a; Arvai et al., 1995b), del complexe Ciclina A/CDK2 (Jeffrey et al., 1995) i del complexe CDK2/CksHs1 (Bourne et al., 1996) ha permès obtenir una idea estructural del complexe Ciclina A/CDK2/CksHs1 i identificar els determinants

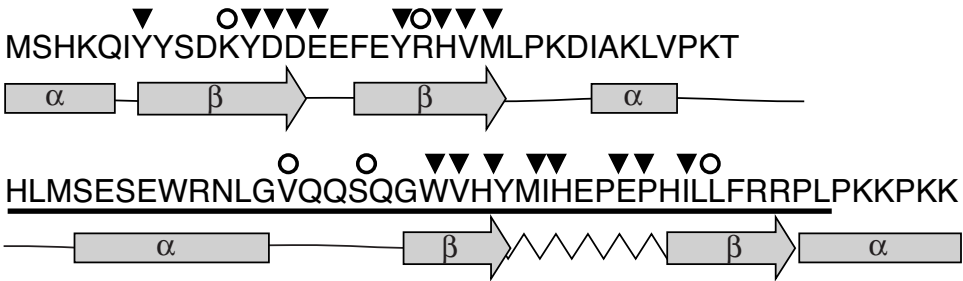


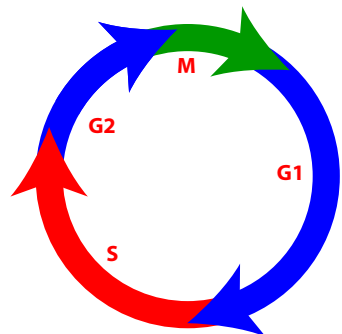
Figura 6. CksHs1: equivalència estructura-funció. Es mostra la seqüència completa de CksHs1 amb els aminoàcids implicats en la interacció amb CDK2 (\blacktriangledown) i els aminoàcids que formen el lloc d'unió aniónic (\circ). La barra indica la seqüència corresponent a la forma mutant CksHs1(36-71), forma que inclou els aminoàcids implicats en la interacció de CksHs1 amb p45^{SKP2}. S'indiquen també la posició de les quatre cadenes β i les quatre α hèlixs que formen l'estructura de CksHs1.

estructurals responsables de la interacció CDK2-CksHs1. CksHs1 s'uneix al lòbul carboxi-terminal de CDK2 mitjançant quatre cadenes β , posicionant-se així lluny de l'extrem amino-terminal, del lloc catalític, dels llocs crítics de les fosforilacions reguladores i del lloc d'unió de la Ciclina A. Oposadament al lloc d'unió a CDK2, CksHs1 té un conjunt de residus molt conservats que formen un *pocket* positiu que es considera un lloc d'unió de fosfats i que queda situat a continuació del lloc catalític de CDK2. La unió de CksHs1 a CDK2 no indueix un canvi conformacional important i aquest no sembla ser el mecanisme pel qual CksHs1 exerceix la seva acció. Alguns autors consideren que les característiques i naturalesa de la unió CDK2-CksHs1 fan pensar que CksHs1 funciona dirigint i facilitant el reconeixement del substrat per part de CDK2 (Pines, 1996).

En general, les proteïnes Cks estan ben caracteritzades a nivell de seqüència i estructura, però es coneix poc de la seva funció. Experiments de sobreexpressió o depleció realitzats en *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, ous de *Xenopus* o *Leishmania mexicana* impliquen les proteïnes Cks en una gran varietat de funcions, donant a vegades resultats contradictoris. Les proteïnes Cks s'han relacionat amb la transició G1/S, l'entrada a mitosi, la sortida de mitosi i la transició G2/M. Per exemple, s'ha descrit que mutacions en la variant Cks1 impedeixen

el pas de les cèl·lules de G1 a S i de G2 a M en *Saccharomyces cerevisiae*. En *Schizosaccharomyces pombe*, p13^{sup1} s'ha relacionat amb la inactivació de la quinassa mitòtica (Moreno et al., 1989), amb la funció del ciclosooma/APC (Shteinberg and Hershko, 1999), amb la funció del proteasoma durant la proteòlisi de la fase M (Kaiser et al., 1999) o amb l'estabilització i activitat d'alguns complexos ciclina/CDK en aquests llevats (Reynard et al., 2000). La funció de les proteïnes Cks en ous de *Xenopus* s'ha relacionat amb la regulació de la fosforilació del ciclosooma/APC (Patra and Dunphy, 1998), amb la fosforilació en tirosines dels complexos ciclina/CDK (Dunphy and Newport, 1989; Patra and Dunphy, 1996) o amb la fosforilació de reguladors del pas G2/M (Patra et al., 1999). Així doncs, la major part dels experiments impliquen les proteïnes Cks en la modulació de l'estat de fosforilació en tirosines i suggereixen que les proteïnes Cks podrien afavorir el procés de fosforilació complementant així l'activitat de la/les quinasses amb les quals s'associen. En humans, la proteïna CksHs1 s'ha relacionat recentment amb la transició G1/S mitjançant el seu paper en la ubiquïtinització i degradació de l'inhibidor p27^{kip1} (Ganoth et al., 2001).

II. HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS



Les dades bibliogràfiques evidencien que p45^{SKP2} és una proteïna reguladora del cicle cel·lular perquè forma part dels complexos SCF^{SKP2} permetent la ubiquitinació i degradació d'altres reguladors o efectors de la maquinària del cicle cel·lular com, per exemple, p27^{Cip1} (Deshaies, 1999; Koepp et al., 1999; Krek, 1998; Lisztwan et al., 1998; Lyapina et al., 1998; Patton et al., 1998; Yu et al., 1998). A més, s'ha descrit que p45^{SKP2} forma part dels complexos actius Ciclina A/CDK2 de la fase S (Zhang et al., 1995), però encara no s'ha atribuït cap implicació funcional a aquesta associació.

Per altra banda, resultats obtinguts en el nostre laboratori mostren que p45^{SKP2} presenta un patró d'expressió característic amb nivells màxims en la fase G1/S i S. Estudis de cinètica d'expressió a nivell d'ARNm i de proteïna realitzats en la línia cel·lular Kit 225, PBLs i limfòcits T purificats i estimulats evidencien la inducció de p45^{SKP2} a les 24 hores i els nivells màxims d'expressió a les 48 hores de l'estimulació (Vigorito, 1999). Aquestes troballes confirmen dades presents a la literatura (Lisztwan et al., 1998; Michel and Xiong, 1998) i alhora suggereixen un important paper de p45^{SKP2} en la fase S, potser no justificat només per la funció que se li ha atribuït fins ara.

Tenint tot això en compte es va hipotetitzar que p45^{SKP2} pot tenir altres funcions en la regulació de la fase S del cicle cel·lular a més de la seva funció en la degradació proteica. Aquestes noves funcions poden tenir a veure amb la regulació de l'activitat dels complexos Ciclina A/CDK2, dels quals p45^{SKP2} forma part en alguns moments. Així mateix es va considerar que les noves funcions de p45^{SKP2} poden estar vehiculitzades per l'acció de p45^{SKP2} sobre altres proteïnes amb les quals interactua.

Així doncs, en concordança amb la hipòtesi plantejada es van determinar els següents objectius específics:

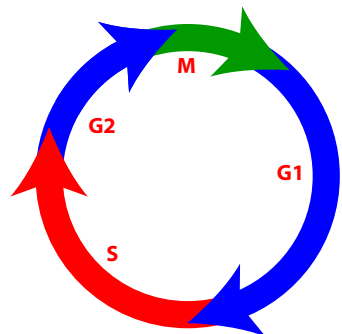
1. Identificació de nous interactors de p45^{SKP2} mitjançant la tècnica *Interaction-trap* emprant una llibreria de limfòcits humans. Aquesta metodologia permet identificar interaccions proteiques desconegudes a partir d'una proteïna de

seqüència coneguda.

2. Confirmació *in vivo* de la/les interaccions descrites en línies cel·lulars de naturalesa limfoide i descripció d'aquestes associacions a nivell molecular i estructural.

3. Descripció i anàlisi de la implicació funcional de la/les noves interaccions descrites en el context de la regulació del cicle cel·lular.

III. MATERIALS I MÈTODES



1. Material biològic

1.1. Cèl·lules

Els assajos de coimmunoprecipitació *in vivo* per a la confirmació de la interacció p45^{SKP2}-CksHs1 es van realitzar en les línies cel·lulars limfoides Cem i Jurkat. La línia cel·lular Cem (ECACC, *European Collection of Animal Cell Cultures*, 85112105) és una línia limfoblàstica T obtinguda d'una pacient caucàsica amb leucèmia limfoblàstica aguda (McCarthy et al., 1965; Uzman et al., 1966). La línia cel·lular Jurkat E6.1 (ECACC 88042803) és una línia derivada de Jurkat FHCRC, línia cel·lular obtinguda d'una leucèmia limfoblàstica T humana (Weiss et al., 1984). Ambdues línies Cem i Jurkat creixen en suspensió.

El sistema d'expressió proteica transitòria utilitzat es va realitzar en la línia cel·lular Cos-7 (ECACC 87021302), una línia cel·lular de ronyó de mono de morfologia fibroblàstica (Gluzman, 1981). Aquesta línia és derivada de cèl·lules CV-1 de simi transformades amb un mutant defectiu de SV40. Aquestes cèl·lules produeixen els factors permissius requerits per a la replicació de cDNAs que contenen l'origen de replicació de SV40. Aquesta línia creix adherida al fons del flascó de cultiu formant una monocapa cel·lular i per a utilitzar-les en suspensió cal tractar-les prèviament amb tripsina (solució de tripsina 0,25 % en PBS) o EDTA (solució de EDTA 2 mM en PBS).

Totes les línies cel·lulars es van cultivar en medi de cultiu RPMI 1640 Glutamax-I amb L-glutamina i L-alanina (Life Technologies) suplementat amb gentamicina (40 mg/l) i 10% de sèrum fetal boví (FBS) (Life Technologies). Les condicions de cultiu van ser 37°C de temperatura, 5% de CO₂ i 90% d'humitat.

1.2. Anticossos

L'anticòs policlonal de conill anti-p45^{SKP2} va ser generat en el nostre laboratori immunitzant ratolins amb proteïna GST-p45^{SKP2} (aa 1-435) produïda en E.

coli. Altres anticossos utilitzats van ser l'anticòs policlonal de cabra anti-p45^{SKP2} (N-19), l'anticòs policlonal de conill anti-CksHs1 (FL-79), l'anticòs policlonal de conill anti-CDK2 (M2) i l'anticòs policlonal de conill anti-p21^{Cip1} (C19) (Santa Cruz Biotechnology). Els anticossos monoclonals utilitzats amb els epítops HA i myc van ser anti-HA (Berkeley Antibody Co) i anti-myc 9E10 (Evan et al., 1985), respectivament. L'anticòs anti-fosfotirosines utilitzat va ser el 4G10 (Druker et al., 1989). Els anticossos marcats amb peroxidasa utilitzats en els Western-blots van ser *anti-mouse* NA 931 i *anti-rabbit* NA 934 (Amersham Pharmacia Biotech). Tots els anticossos esmentats van ser utilitzats en assajos de Western-blot. Pels estudis de coimmunoprecipitació en les línies cel·lulars Cem i Jurkat, es va utilitzar l'anticòs monoclonal anti-p45^{SKP2} (H-435) (Santa Cruz Biotechnology). Finalment, en els experiments d'immunofluorescència indirecta es va utilitzar l'anticòs primari anti-myc 9E10 (Evan et al., 1985) i l'anticòs secundari *anti-mouse IgG TRITC Conjugate* (Sigma).

1.3. Plàsmids

Els plàsmids utilitzats en aquest estudi poden incloure's en tres grups; els plàsmids de llevat propis de la tècnica *Interaction-trap*, els plàsmids utilitzats en els sistema d'expressió transitòria de proteïnes en cèl·lules Cos-7 i els plàsmids utilitzats per a la producció de proteïnes en un sistema bacterià. El primer grup de plàsmids està descrit en una altra secció (veure "*Interaction-trap*"), aquest apartat fa esment a la resta de plàsmids.

Els diferents plàsmids d'expressió es van fer utilitzant les tècniques estàndard i van ser confirmats per seqüenciació nucleotídica automàtica. Les seqüències completes de p45^{SKP2} i p19^{SKP1} van ser obtingudes dels plàsmids pSK-p45^{SKP2} i pSK-p19^{SKP1}, amablement proporcionats pel Dr. Beach. La seqüència completa de CDK2 va ser obtinguda del plàsmid pCMV-CDK2, amablement proporcionat pel Dr. Harlow. Els cDNAs codificants de les seqüències completes de CksHs1, GATE-16^{GEF2} i c-89 es van obtenir mitjançant PCR (*Polymerase chain reaction*)

emprant les llibreries de cèl·lules HeLa i de limfòcits humans utilitzades a la tècnica *Interaction-trap*.

Els vectors utilitzats per a l'expressió transitòria de proteïnes en cèl·lules Cos-7 son derivats del vector d'expressió pMT2. El vector pMT2 conté diversos elements de regulació eucariotes: (1) l'origen de replicació i un *enhancer* de SV40 (2) el promotor d'adenovirus AdMLP unit a una còpia cDNA del líder tripartit de l'adenovirus (3) un intró híbrid format per un lloc *splice* 5' del primer exó del líder tripartit i un lloc *splice* 3' d'un gen d'immunoglobulina de ratolí (4) la senyal de poliadenilació de SV40 i (5) la regió d'adenovirus VA₁RNA. El vector pMT2 també conté seqüències codificants de DHFR murí. Aquests elements permeten la transcripció dels cDNAs inserits i l'expressió d'alts nivells de la proteïna que codifiquen en cèl·lules Cos-7. Aquest vector conté també el gen codificant per la resistència a l'antibiòtic ampicil·lina.

Diferents regions dels cDNAs de p45^{SKP2}, CDK2, p19^{SKP1}, CksHs1, GATE-16^{GEF2} i c-89 es van clonar en els vectors pMT2, pMT2-HA, pMT2-myc i pMT2-GST. PMT2-HA és un vector pMT2 que conté la seqüència del *tag* epitòpic HA (YPYDVPDYA) immediatament abans del lloc de clonatge (Serra-Pages et al., 1995). PMT2-myc és un vector pMT2 que conté la seqüència codificant del *tag* epitòpic myc (EQKLISEEDL) immediatament abans del lloc de clonatge (Medley et al., 2000). PMT2-GST és un vector pMT2 que conté la seqüència codificant de la proteïna GST (*glutathione-S-transferase*) immediatament abans del lloc de clonatge (Mongay et al., 2001 *in press*). Per els estudis de fluorescència es va emprar el plàsmid d'expressió pSR α HAGFP, plàsmid que conté el *tag* epitòpic HA i el cDNA codificant de la proteïna fluorescent GFP (*green fluorescent protein*) i que va ser generat a partir del plàsmid d'expressió pSP65-SR α .2 per C. Serra-Pagès (resultats no publicats).

El vector utilitzat per a l'expressió i purificació de la proteïna His-CksHs1 en bacteris va ser pRSETB (Invitrogen). El vector pRSETB és un vector que conté el promotor de la RNA polimerassa T7 (pT7) i que permet l'expressió gènica utilitzant aquesta polimerassa. PT7 conté un lloc d'unió ribosòmic (rbs) i un

codó d'inici (ATG). Entre el codó d'inici i el lloc de clonatge hi ha la seqüència corresponent a 6 histidines, la qual cosa permet l'expressió de la proteïna d'interès fusionada a histidines. A més, aquest vector conté el gen codificant per la resistència a l'antibiòtic ampicil·lina, l'origen de replicació CoIE i Fl ori. El vector utilitzat per a l'expressió i purificació de la proteïna p21^{Cip1} va ser pGEX4T2 (Amersham Pharmacia Biotech). El vector pGEX es un vector que conté la seqüència codificant de la proteïna GST (*Glutathione-S-Transferase*) abans del lloc de clonatge i permet així l'expressió de proteïnes de fusió amb GST.

2. Tècniques de biologia molecular

2.1. Extracció i purificació de DNA plasmídic

Preparació de DNA plasmídic a petita escala (Mètode de lisi alcalina)

El mètode de lisi alcalina (Birnboim and Doly, 1979) permet l'obtenció de DNA plasmídic d'un cultiu bacterià on ha estat introduït l'esmentat plàsmid.

1. Inocular la colònia bacteriana que conté el plàsmid d'interès en 1,5 ml de medi LB + ampicil·lina (2 µg/ml d'una solució d'ampicil·lina a 100 µg/ml). Cultivar O/N.
2. Centrifugar 15'' a 14000 rpm.
3. Eliminar el sobrenedant mitjançant aspiració amb bomba de buit.
4. Ressuspendre en 100 µl de Solució I a TA. Vortex. Incubar 5' a TA.
5. Afegir 200 µl de Solució II a TA. Vortex suau. Incubar 5' en gel.
6. Afegir 150 µl de Solució III. Vortex suau. Incubar 5' en gel.
7. Centrifugar 3' a 14000 rpm.
8. Transferir el sobrenedant a nous tubs. Afegir 1 ml d'etanol. Barrejar per inversió.

9. Centrifugar 2' a 14000 rpm.
10. Rentar dues vegades amb etanol 80%.
11. Ressuspendre en 50 µl de TE + Rnasa (100 µg/ml).

El pas final d'aquesta tècnica és la comprovació que el DNA obtingut correspon al DNA d'interès, procés que es fa mitjançant digestions enzimàtiques i seqüenciació nucleotídica automàtica.

Medi LB (Luria-Bertani) (per 1 litre): 10 g bacto-tryptone, 5 g bacto-yeast extract, 10 g NaCl. Ajustar el volum i a pH 7,0. Autoclavar.

Solució I: sucrosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM.

Solució II: NaOH 0,2 N, SDS 1%.

Solució III: KOAc 3 M, HOAc 2 M pH 4,8.

TE: Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM pH 8,0.

Preparació de DNA plasmídic a gran escala

L'extracció i preparació de DNA plasmídic a gran escala es va fer utilitzant el *Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) per a preparació a escala mitjana, partint de 100 ml de suspensió bacteriana i seguint el protocol del fabricant. El pas final d'aquesta tècnica va ser la comprovació que el DNA obtingut correspon al DNA d'interès, procés que es va fer mitjançant digestions enzimàtiques i seqüenciació nucleotídica automàtica.

Purificació de fragments de DNA

La purificació de fragments de DNA es va fer utilitzant kits comercials. Es va utilitzar *QIAquick PCR purification Kit* (Qiagen) per a la purificació de productes de PCR i *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) per a la purificació de fragments

de DNA de 70 bp a 10 Kb utilitzant gels d'agarosa. Aquest procés de purificació va permetre eliminar les restes de tampons, deoxinucleòtids, DNA polimerassa i enzims de restricció, entre d'altres, evitant així la seva interferència en les tècniques posteriors.

2.2. Subclonació de DNA en vectors plasmídics

Digestió amb enzims de restricció

Els enzims de restricció més utilitzats per a clonar els fragments de DNA van ser *EcoRI* i *XhoI*. En els casos en què les característiques del vector o del fragment van fer impossible utilitzar aquests enzims, es van utilitzar *Sall*, *HindIII*, *XbaI*, *NotI* o *PvuI* com a alternatives. La composició dels tampons utilitzats per a les digestions difereix amb cada enzim i amb cada fabricant, sobretot pel que fa a la concentració de NaCl. En cada cas es van utilitzar els tampons proporcionats pels fabricants (TaKaRa, NBI Fermentas, New England BioLabs). Les unitats d'enzim emprades en cada digestió i la duració d'aquesta venen determinades per la quantitat de DNA a digerir, tenint en compte que 1 Unitat d'enzim de restricció és la quantitat d'enzim necessària per a digerir 1 µg de DNA en 1 hora en condicions òptimes de pH i temperatura. En cada cas el procés de digestió es va completar amb la comprovació d'aquesta mitjançant electroforesi en gels d'agarosa.

Desfosforilació de DNA linealitzat

Ocasionalment va ser necessària la clonació d'un fragment en un plàsmid on tots els extrems estaven tallats amb el mateix enzim de restricció. En aquest cas, va ser necessària la desfosforilació prèvia del plàsmid per a minimitzar les possibilitats de recircularització d'aquest en la reacció de lligació. Aquest procés requereix la utilització de CIAP (*calf intestinal alkaline phosphatase*) i s'ha realitzat

seguint el protocol descrit a la literatura (Sambrook et al., 1989) i especificat a continuació:

1. Digerir el plàsmid de DNA (10-20 µg) amb l'enzim de restricció escollit i comprovar que la digestió ha estat completa mitjançant electroforesi en gel d'agarosa.
2. Purificar la digestió amb extracció fenol:cloroform i mitjançant l'ús de kits comercials (veure "purificació de DNA plasmídic").
3. Afegir 10 µl del tampó 10X de l'enzim CIAP, la quantitat apropiada de CIAP (1 unitat/100 pmols) (MBI Fermentas) i incubar a 37°C durant 30'.
4. Afegir EDTA pH 8,0 (concentració final 5 mM) al final de la incubació.
5. Purificar la mostra mitjançant extracció amb fenol:cloroform i precipitar amb etanol (utilitzar acetat d'amoni 3M a pH 7,0). Redissoldre el DNA precipitat en TE pH 7,6 a una concentració ~100 µg/ml.

Tampó 10X CIAP: ZnCl₂ 10 mM, MgCl₂ 10 mM, Tris-HCl 100 mM pH8,3.

Reacció de lligació d'un fragment de DNA en un plàsmid

Els fragments necessaris per a la lligació van ser obtinguts o bé per PCR o bé per digestió d'altres construccions. Aquests fragments van ser digerits amb l'enzim de restricció adequat i purificats, obtenint-se així fragments amb extrems cohesius. Les reaccions de lligació es van fer utilitzant el *DNA Ligation Kit* (TaKaRa) o diverses *DNA ligases* (Promega, TaKaRa, MBI Fermentas). En cada cas es va seguir el protocol recomanat pel fabricant. Posteriorment es van utilitzar aquestes reaccions de lligació per a transformar bacteris competents *E. coli*.

2.3. Preparació i transformació de bacteris *E. coli* competents

Preparació de bacteris competents per xoc tèrmic (Mètode de clorur de cobalt d'hexamina/DMSO)

La utilització del mètode de clorur de cobalt d'hexamina/DMSO va permetre la obtenció de bacteris congelades *E. coli* (DH5) competents per a transformacions per xoc tèrmic. Aquest mètode està descrit a la literatura (Hanahan, 1983) i permet obtenir una alta eficiència de transformació, aproximadament 10^8 colònies bacterianes transformades/ μg de DNA plasmídic transformat. El protocol utilitzat és el següent:

1. Inocular 300 ml de medi SOB (NaCl 0,3 M) amb ~10 colònies de bacteris DH5. Créixer O/N a 25°C.
2. Mesurar la OD_{550} . Centrifugar els bacteris a 4000 rpm durant 10' a 4°C.
3. Ressuspendre el *pellet* en solució FSB. La quantitat de FSB a afegir s'ha d'ajustar en cada cas depenent de la OD_{550} , la qual ha d'estar entre 0,5 i 1,0. La proporció és 30 ml de FSB si OD_{550} és 0,5, augmentant la quantitat a afegir a mesura que augmenta la OD_{550} . Posar en gel durant 15'.
4. Afegir DMSO als bacteris en agitació lenta i contínua. La quantitat a afegir també depèn de la OD_{550} . Així, si OD_{550} és 0,5 s'afegeixen 1050 μl de DMSO. Posar en gel durant 10'.
5. Afegir DMSO, la mateixa quantitat i en les mateixes condicions. Posar en gel durant 5'.
6. Aliquotar en gel. Congelar immediatament i conservar a -80°C.
7. Controlar l'eficiència dels bacteris resultants.

Medi SOB (NaCl 0,3 M) (per 1 litre): 20 g triptona, 5 g extracte de llevat, 18 g NaCl. Ajustar el pH a 7,5 amb KOH. Autoclavar. Afegir 10 ml d'una solució MgSO_4 1 M/ MgCl_2 1 M (la concentració final del Mg és 20 mM).

Solució FSB: KCl 100 mM, MnCl₂·4H₂O 45 mM, CaCl₂·2H₂O 10 mM, HAcOCl₃ 3 mM, KOAc 10 mM, glicerol 10%. Ajustar a pH 6,4 amb HCl 0,1 N. Filtrar. Guardar a 4°C.

Transformació de bacteris per xoc tèrmic

La tècnica descrita a continuació va ser descrita per Hanahan (Hanahan, 1983).

1. Afegir el DNA procedent de la reacció de lligació als bacteris *E. coli* (DH5) competents descongelats en gel. Per a obtenir òptima eficiència, cal que la quantitat de solució de DNA no superi el 5% del volum de les cèl·lules competents. Barrejar suaument. Deixar els tubs en gel durant 30'.
2. Transferir els tubs en un bany d'aigua pre-escalfat a 42°C. Deixar-hi els tubs durant 2'.
3. Transferir els tubs immediatament a un bany de gel. Deixar-hi els tubs durant 5'.
4. Afegir 800 µl de medi SOC a cada tub. Transferir els tubs a un incubador en agitació durant 1h a 37°C.
5. Transferir el volum adequat (fins a 200 µl per a una placa de 90 mm) de les cèl·lules competents transformades a plaques fetes amb medi LB-agar i ampicil·lina (20 µl/ml d'una solució de 100 µg/ml d'ampicil·lina).
6. Deixar les plaques a TA fins que s'absorbeixi el líquid. Després, invertir les plaques i incubar-les a 37°C O/N.

Posteriorment a la transformació es va procedir a la identificació de les colònies bacterianes portadores del plàsmid recombinant. La identificació de les colònies bacterianes útils va consistir en l'extracció de DNA a petita escala i la comprovació de que aquest DNA contenia el plàsmid desitjat. La comprovació de l'existència del plàsmid desitjat es va fer mitjançant digestió amb enzims de restricció com

a mètode d'*screening* i la seqüenciació nucleotídica automàtica com a mètode confirmatori.

Medi SOC (per 1 litre): 20 g bacto-triptona, 5 g bacto-yeast extract, 0,5 g NaCl., 10 ml de solució KCl 250 mM. Ajustar el volum i el pH a 7,0. Autoclavar. Afegir 5 ml d'una solució MgCl₂ 2 M i 20 ml d'una solució de glucosa 1 M.

Medi LB (medi Luria-Bertani)-agar (per 1 litre): 10 g bacto-triptona, 5 g bacto-yeast-extract, 10 g NaCl, 15 g bacto-agar. Ajustar el volum i el pH a 7,0. Autoclavar.

2.4. Electroforesi de DNA en gels d'agarosa

L'electroforesi de DNA en gels d'agarosa es va utilitzar per a separar, identificar i purificar fragments de DNA. La tècnica consta de tres passos (Ausubel et al., 1987-1994) (1) preparació d'un gel amb agarosa, TBE X1 i bromur d'etidi; la concentració d'agarosa depèn de la grandària del fragment de DNA que volem separar (2) separació electroforètica de la mostra i (3) visualització directa del gel amb transil·luminador de llum ultraviolada.

Solució TBE X10 (Tris-borat/EDTA): Tris base 890 mM, àcid bòric 890 mM, EDTA 20 mM.

2.5. Seqüenciació nucleotídica automàtica

La seqüenciació nucleotídica automàtica va ser utilitzada per a identificar els interactors positius trobats en els diversos *screenings* fets amb la tècnica *Interaction-trap* i per a comprovar totes les construccions de DNA realitzades. La tècnica utilitzada segueix els principis bàsics de la seqüenciació amb dideoxy (Sanger et al., 1977). Per al procés de seqüenciació es va emprar el kit *ABI PRISM™ dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* i el *ABI PRISM 377 DNA Sequencer* (Perkin Elmer Applied Biosystems) seguint les instruccions del

fabricant.

1. Barrejar els components següents en un tub (per cada reacció): 4 µl de *Terminator Ready Reaction Mix*, 5 µl (~1 µg) de DNA *template* i 3'2 pmols de *primer*.
2. Posar els tubs en un termociclador (PE Applied Biosystems). El programa recomanat per a seqüenciar és 96° 1' i 25 cicles de 96° 30"/50° 15"/60° 4'.
3. Precipitar el producte de seqüència amb etanol i acetat de sodi.
4. Ressuspendre les mostres en el tampó de càrrega adequat i carregar les mostres en el gel de seqüenciació.

Els diferents *primers* utilitzats van ésser sintetitzats per GIBCO BRL Life Technologies. La seqüència dels mateixos s'especifica a la taula I.

Taula I.

Nom	Seqüència
T7	5'-AATACGACTCACTATAG-3'
LEX	5'-CACCATTGAAGGGCTGGCGG-3'
5PMT2HA	5'-ATTGCCACCATGGGATCCTA-3'
5PMT2MYC	5'-TGAATTGCCACCATGGAGCA-3'
5PSRALFAHA	5'-CGGAAGTGTTACTTCTGCTC-3'
5PMT2GST	5'-TCGGATCTGGTTCCGCGTGG-3'
3PMT2	5'-CGCGAAATCGCAGCCCTGAGC-3'
PJG45-762-783	5'-GAAATTGAAGCGGATGTTAACG-3'
PJG45-934-913	5'-CAAGGTAGACAAGCCGACAACC-3'

2.6. Reacció en cadena de la polimerassa (PCR)

L'amplificació enzimàtica *in vitro* de fragments específics de DNA es va fer mitjançant PCR (*polymerase chain reaction*) seguint els principis bàsics descrits a

la literatura (Embury et al., 1987; Kleppe et al., 1971; Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1986; Saiki et al., 1988; Saiki et al., 1985).

Els diferents *primers* utilitzats van ésser sintetitzats per GIBCO BRL Life Technologies. La seqüència dels mateixos s'especifica a la taula II.

Taula II.

Nom	Seqüència
5P45	5'-GCGAATTCATGCACGTATTTAAAACCTCCC-3'
3P45	5'-CCGCTCGAGTCATAGACAACCTGGGCTTTTGC-3'
P45-53	5'-GCGAATTCGACCTTACAGGTAAAAATCTGCAC-3'
5CKS1	5'-GCGAATTCATGTCTGCACAAACAAATTTAC-3'
3CKS1	5'-CCGCTCGAGTCATTTCTTTGGTTTCTTGGG-3'
CKS1-19	5'-GCGAATTCATCGACATGTCATGCTGCCC-3'
CKS1-36	5'-GCGAATTCATCTGATGTCTGAATCTGAATG-3'
CKS1-71	5'-CCGCTCGAGTCAGCGCCGGAACAGCAAGATG-3'
5GEF2	5'-GCGAATTCATGAAGTGGATGTTCAAGGAG-3'
5RAB5IP	5'-GCGAATTCATGAGCGGCGGGCGGCGGAAG-3'

2.7. Generació de mutants

Mutacions puntuals

La realització d'una mutació puntual va ser possible emprant el kit *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) seguint les instruccions del fabricant. Aquest mètode permet realitzar la mutació específica d'un aminoàcid sobre un plàsmid de doble cadena de manera directa evitant així la necessitat de subclonacions intermèdies. Aquest procés utilitza dos *primers* que contenen la mutació i que, unint-se a cadenes oposades del plàsmid, generen un plàsmid mutant utilitzant una DNA polimerassa (*Pfu Turbo DNA polymerase*) i diferents

cicles de temperatura. Aquest nou plàsmid no està tancat del tot, presenta el que s'anomenen *nicks*. El plàsmid mutat és seleccionat mitjançant l'ús d'un enzim específic per DNA metil·lat (DpnI) que digereix el plàsmid inicial. El plàsmid mutat és transformat en *E. coli* (*Epicurian Coli XL1 Blue supercompetent cells*), les quals permeten la reparació dels *nicks* i el tancament complet del plàsmid mutat. El procés es completa amb la seqüenciació del nou plàsmid per a comprovar la presència de la mutació.

Aquesta tècnica es va aplicar per a la substitució d'una *tyr* per una *ala* en la posició 15 de la seqüència aminoacídica de CDK2. Es va substituir el triplet TAC per GCC en la seqüència nucleotídica del CDK2 *full-length*. El plàsmid inicial utilitzat va ser pMT2-GST on s'havia subclonat prèviament la seqüència completa de CDK2. Els diferents *primers* utilitzats van ésser sintetitzats per GIBCO BRL Life Technologies. La seqüència dels mateixos s'especifica a la taula III.

Taula III.

Nom	Seqüència
CDK2Y>A-5	5'-GGAGAGGGCACGGCCGGAGTTGTGTA-3'
CDK2Y>A-3	5'-TACACAACCTCCGGCCGTGCCCTCTCC-3'

Mutacions per delecció

Els mutants deleccionats de p45^{SKP2} i CksHs1 es van obtenir mitjançant PCR, purificació i subclonació. A continuació les diferents construccions amb les formes mutades es van comprovar mitjançant seqüenciació nucleotídica automàtica. Els diferents *primers* utilitzats van ésser sintetitzats per GIBCO BRL Life Technologies. La seqüència dels mateixos s'especifica a la taula IV.

Taula IV.

Nom	Seqüència
5P45	5'-GCGAATTCATGCACGTATTTAAAACTCCC-3'
3P45	5'-CCGCTCGAGTCATAGACAACTGGGCTTTTGC-3'
P45-53	5'-GCGAATTCGACCTTACAGGTAAAAATCTGCA-3'
5CKS1	5'-GCGAATTCATGTCGCACAAACAAATTTAC-3'
3CKS1	5'-CCGCTCGAGTCATTTCTTTGGTTTCTTGGG-3'
CKS1-19	5'-GCGAATTCTATCGACATGTCATGCTGCCC-3'
CKS1-36	5'-GCGAATTCATCTGATGTCTGAATCTGAATG-3'
CKS1-71	5'-CCGCTCGAGTCAGCGCCGGAACAGCAAGATG-3'

3. Tècniques amb llevats

3.1. Tècnica *Interaction-trap*

Descripció de la tècnica

La *Interaction-trap* és un sistema *two-hybrid* per a la clonació de cDNAs de seqüència desconeguda que codifiquen proteïnes que interaccionen amb una proteïna, la seqüència de la qual és coneguda. És a dir, aquest mètode permet identificar noves interaccions proteïques d'una proteïna coneguda. En aquest mètode la detecció de les interaccions proteïna-proteïna és duta a terme utilitzant la transcripció de gens *reporters* de llevats com a fenotip indicatiu de la interacció. Aquest sistema també pot ésser utilitzat per a l'estudi d'interaccions entre proteïnes conegudes.

La base teòrica d'aquesta tècnica és l'estructura modular dels dominis dels factors de transcripció eucariotes. Molts activadors de la transcripció eucariotes tenen, com a mínim, dos dominis funcionals diferents; un domini d'unió que s'uneix específicament a la seqüència de DNA i que per ell mateix no activa la

transcripció i un domini d'activació que activa la transcripció (Hope and Struhl, 1986; Keegan et al., 1986). Per a activar la transcripció cal la unió dels dos dominis, però no cal que aquesta sigui covalent (Ma and Ptashne, 1988). Així doncs, es pot utilitzar la transcripció en llevats per a estudiar la interacció entre dues proteïnes si una d'elles es fusiona a un domini d'unió al DNA i l'altra es fusiona al domini d'activació (Fields and Song, 1989). Així, es produeixen dues proteïnes híbrides (*two-hybrid*). En cas d'interacció de les dues proteïnes es forma el factor de transcripció complet i s'activa la transcripció. L'activació de la transcripció s'objectiva per la presència de gens *reporters*, la transcripció dels quals es pot valorar per un canvi de fenotip en els llevats en els quals té lloc l'experiment.

Amb aquest suport teòric, diversos laboratoris han desenvolupat diferents sistemes de clonació de proteïnes per el mètode *two-hybrid* (Chien et al., 1991; Dalton and Treisman, 1992; Durfee et al., 1993; Gyuris et al., 1993; Vojtek et al., 1993). El nom *Interaction-trap* fa referència al sistema desenvolupat per Gyuris et al. Tots aquests sistemes inclouen tres components bàsics, amb petites diferències entre ells. Els tres components bàsics del sistema *Interaction-trap* són; (1) vector de llevat que permet l'expressió d'una proteïna coneguda fusionada al domini d'unió a LexA (domini d'unió al DNA). En el nostre cas, aquesta proteïna ha estat p45^{SKP2} (2) vector de llevat que permet l'expressió de moltes proteïnes fusionades a B42 (domini d'activació de la transcripció). Aquestes proteïnes han estat codificades per cDNAs que pertanyen a la llibreria seleccionada. En aquest cas s'ha treballat amb una llibreria de limfòcits T humans i amb una llibreria de cèl·lules HeLa. Les proteïnes codificades pels cDNAs de la llibreria s'expressen amb un promotor condicional, el gen del GAL1. Aquest promotor permet l'expressió de la llibreria només quan hi ha galactosa al medi de cultiu. L'ús d'aquest promotor condicional permet demostrar que l'activació dels gens *reporter* depèn de l'expressió de la llibreria. (3) gens *reporters* de llevat que contenen llocs d'unió a LexA. Cap proteïna endògena de llevat s'uneix a l'operador de LexA. La *Interaction-trap* utilitza una soca de llevats amb dos gens *reporters*, LEU2 i lacZ. La transcripció de lacZ permet la producció de β -galactosidasa i els llevats creixent

en un medi de cultiu amb X-Gal formen colònies de color blau. El segon gen *reporter* és LEU2, gen que actua com a marcador selectiu perquè codifica l'enzim necessari per a la biosíntesi de leucina. Les característiques genètiques de la soca de llevats utilitzada fan que aquest requereixi leucina per créixer. Utilitzant un medi de cultiu deficitari en leucina, només creixen aquells llevats on hi hagi hagut la transcripció del gen LEU2.

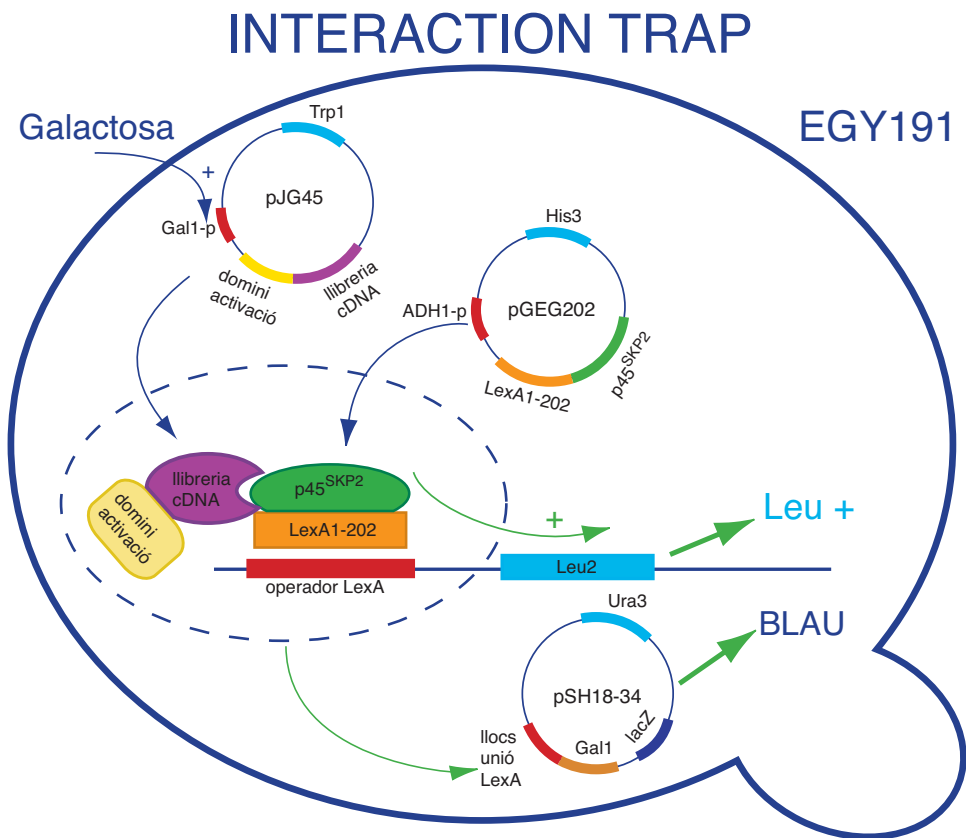


Figura 7. Tècnica d'*Interaction-trap*. Es mostra un dibuix que il·lustra el funcionament de la tècnica *Interaction-trap*.

En un *Interactor-hunt* o *screening* es transfecten llevats amb el vector procedent de la llibreria i el vector que conté l'esquer. El vector que conté l'esquer s'expressa constitutivament i s'uneix als operadors de LexA més amunt dels gens reporters LEU2 i lacZ, però no pot activar la seva transcripció. L'expressió de les proteïnes codificades pels cDNAs de la llibreria està determinada per l'expressió condicional del promotor GAL1. En un medi amb glucosa el promotor GAL1 està reprimat, no s'expressa cap proteïna codificada pels cDNAs de la llibreria i els llevats no creixen en absència de leucina. Quan els llevats creixen en un medi amb galactosa s'expressen les proteïnes codificades pels cDNAs de la llibreria, aquelles proteïnes que interaccionen amb p45^{SKP2} activen la transcripció dels gens *reporters* LEU2 i lacZ. Les cèl·lules de llevat que contenen les proteïnes que interaccionen amb p45^{SKP2} formen colònies en un medi amb galactosa i sense leucina i formen colònies de color blau en un medi amb galactosa i X-Gal.

Plàsmids d'expressió de proteïnes de fusió, soques de llevat, *reporters* i llibreries

El plàsmid que permet l'expressió de l'esquer, la proteïna de fusió entre p45^{SKP2} i LexA (domini d'unió al DNA), és el pEG202 (Gyuris et al., 1993). pEG202 és un plàsmid de llevat multicòpia que conté l'origen de replicació de llevat (2 mm ori), el gen del marcador selectiu HIS3 i la regió codificant del *full-length* LexA (aminoàcids 1-202) que inclou el domini d'unió al DNA i està flanquejada per el promotor i terminador de llevat ADH1. També conté l'origen de replicació de *E. coli* (pBR ori) i el gen de resistència a l'antibiòtic ampil·lina (AmpR). LexA no conté una senyal de localització nuclear, però el promotor ADH1 permet uns nivells d'expressió suficients per a assegurar l'entrada al nucli. Aquest plàsmid pot ser transformat i mantingut en una soca de llevat his3 (per exemple, EGY048 i EGY191) mitjançant la selecció dels transformants en un medi sense histidina. Els transformants expressen així constitutivament p45^{SKP2} amb LexA a l'extrem amino-terminal.

PJG4-5 és el plàsmid de llevat que permet l'expressió de proteïnes de fusió entre les proteïnes codificades pel cDNA de la llibreria utilitzada i B42 (domini d'activació de la transcripció) (Gyuris et al., 1993). pJG4-5 conté l'origen de replicació de llevat (2 mm ori), el marcador selectiu TRP1, el promotor GAL1, la senyal de localització nuclear SV40 (PPKKKRKVA), el domini d'activació B42 i un *tag* d'hemaglutinina (HA) (YPYDVPDYA). Aquest plàsmid també conté l'origen de replicació de *E. coli* (pUC ori) i el gen de resistència a la ampicil·lina (AmpR). B42 procedeix de *E. coli* i funciona com un activador de la transcripció bastant fort en llevats. Les proteïnes codificades pels cDNAs de la llibreria s'expressen amb els residus de fusió a l'extrem amino-terminal. La presència del promotor GAL1, permet l'expressió condicional de les proteïnes de fusió en llevats creixent en un medi amb galactosa, però no amb glucosa.

Les soques de llevats utilitzades van ser EGY048 (MATatrp1 *ura3 his3 LEU2::pLexAop6-LEU2*) i EGY191 (MATatrp1 *ura3 his3 LEU2::pLexAop2-LEU2*) (Gyuris et al., 1993). Ambdues tenen integrat un gen LEU2 en el qual s'han substituït les seves regions reguladores per operadors de LexA i que funciona com a un primer gen *reporter* (LexAop-LEU2). La presència d'un únic gen LEU2 i l'existència dels operadors de LexA com a reguladors del gen LEU2, fa que aquestes soques no creixin en medis deficitaris en leucina a excepció de quan el gen LexAop-LEU2 és transcrit. El nombre i l'afinitat dels operadors de LexA situats en el gen LEU2 i, per tant, la sensibilitat de la soca constitueixen la principal diferència entre les dues soques de llevats. EGY048 és una soca d'alta sensibilitat degut a la presència de tres operadors de LexA d'alta afinitat; podent-se així utilitzar per a la detecció d'interaccions febles entre un interactor i un esquer. La soca de llevats EGY191, en canvi, conté un operador de LexA enlloc de tres (E.Golemis, D.Krainc, R.L.F., dades no publicades), és una soca menys sensible i és molt útil quan l'esquer actua com a activador lleu de la transcripció, com és el cas de p45^{SKP2}. Les soques de llevat utilitzades tenen, a més de la mutació en el gen endogen LEU2, mutacions en els gens *his3*, *trp1* i *ura3* les quals permeten la selecció dels plàsmids utilitzats. La mutació *his3* es complementa amb el gen HIS3 present al vector d'expressió de l'esquer pEG202-

p45^{SKP2}. Les mutacions *trp1* i *ura3* es complementen amb el gen TRP1 del plàsmid de la llibreria i el gen URA3 del plàsmid *reporter lacZ*, respectivament.

El segon *reporter* utilitzat a la *Interaction-trap* és LexAop-lacZ, contingut en el plàsmid pSH18-34. Aquest és un plàsmid 2mm que conté el promotor GAL1 on s'han substituït les UASg (*upstream activating sequences*) per operadors de LexA, el gen lacZ i el gen Ura3 (Yocum et al., 1984). A més, aquest plàsmid conté un origen de replicació de *E. coli* (pBR ori) i el gen de resistència a la ampicil·lina (AmpR). En absència d'interacció proteica, no s'activa la transcripció i els llevats amb aquest *reporter* no produeixen β -galactosidasa i son blancs en plaques de X-Gal. L'ús d'un segon sistema *reporter lacZ* permet la millor detecció de falsos positius originats per mutacions en els llevats o per l'activació basal de la transcripció del gen LEU2, ja que LexAop-lacZ és menys sensible que LexAop-LEU2. La utilització del *reporter lacZ* proporciona, a més, una mesura de la quantitat de transcripció causada per la interacció de l'esquer amb la proteïna de la llibreria. Aquesta dada quantitativa s'assoleix mitjançant la mesura de l'activitat β -galactosidasa, la qual és directament proporcional a la quantitat de transcripció de lacZ.

Tots els plàsmids de llevats utilitzats a la *Interaction-trap*, així com les soques de llevat utilitzades i la llibreria de cDNA procedent de cèl·lules HeLa van ser amablement proporcionats pel Dr. R.Brent i la Dra. E.Golemis (Department of Genetics, Harvard Medical School) i van ser utilitzats com s'ha descrit (Gyuris et al., 1993; Serra-Pages et al., 1995). La llibreria de limfòcits humans LexA cDNA és *Human Lymphocyte Matchmaker Lex cDNA Library* (Clontech) derivada de la línia cel·lular de cèl·lules T SLB-I transformada amb HTLV-I. La construcció de llibreries és una tècnica complexa descrita a la literatura (Gubler and Hoffman, 1983; Gyuris et al., 1993).

Screening o Interactor-hunt

El procés d'*screening* o *Interactor-hunt* utilitzant el sistema *Interaction-trap* descrit a continuació va ser descrit per Gyuris et al. [Gyuris, 1993 #7] i modificat per Serra-Pagès et al. (Serra-Pagès et al., 1995).

1. TESTAR L'ACTIVACIÓ BASAL DE L'ESQUER.

Abans de començar un *Interactor-hunt* és necessari testar l'esquer amb la proteïna que volem estudiar per assegurar-nos que aquesta no activa basalment la transcripció dels gens *reporters* LEU2 i lacZ de la soca de llevats amb la que treballem. Aquest test es fa amb la soca de selecció (la soca que ja conté els plàsmids amb l'esquer pEG202-proteïna estudiada i el *reporter* lacZ pSH18-34) en la qual s'hi transforma el plàsmid buit de la llibreria, pJG4-5 (veure "transformació de llevats"). La manera més útil de mesurar el nivell d'activació és determinant la fracció de cèl·lules que poden créixer en absència de leucina (en plaques -leu). Aquesta fracció es representa com el nombre de colònies que creixen en una placa -leu (colònies leu+) entre el nombre de colònies que creixen en una placa amb leucina (nombre de cèl·lules vives o ufc). Un bon esquer és aquell que té una fracció de colònies leu+/ufc menor a 10^{-6} . Els esquers amb una activació moderada de la transcripció presenten fraccions de 10^{-4} a 10^{-5} .

Quan un esquer activa basalment la transcripció en una soca de llevats determinada hi ha la possibilitat d'utilitzar una altra soca de llevats que contingui menys operadors de LexA en el reporter de LEU2. Una altra possibilitat és utilitzar una soca de llevats diploid en la qual, per raons desconegudes, les fusions de LexA activen menys els reporters. Per últim, si cap de les aproximacions anteriors soluciona el problema, es pot treballar amb mutants delecionats de l'esquer que, un cop testats, no activin basalment la transcripció.

Abans de començar els *screenings* es va testar l'esquer pEG202-P45^{SKP2}, el qual va resultar ser un activador basal de la transcripció dels reporters LEU2 i lacZ

en la soca de llevats EGY048. A continuació es va testar pEG202-P45^{SKP2} en la soca EGY191, soca que conté un operador de LexA enloc de tres i on no es va objectivar activació basal de la transcripció. Per això, la soca EGY191 va ser la soca de llevats escollida per a la realització dels nostres *screenings*.

2. TRANSFORMACIÓ DE LA LLIBRERIA.

El primer pas de l'*screening* és la transformació de la llibreria en la soca de selecció (soca que conté els plàsmids de l'esquer i el reporter lacZ). Una llibreria adequada per a l'*Interaction-trap* conté 10⁶ cDNAs individuals en el plàsmid pJG4-5, representant a molècules de mRNA amb freqüència mínima de 10⁶ en la població de mRNAs utilitzats per a fer la llibreria. Per tant, és important obtenir una gran eficiència (>10⁵) en la transformació de la llibreria, ja que així s'assegura la representació de tots els cDNAs presents en aquesta i la presència de ~1 cDNA de la llibreria per cèl·lula de llevat. Val a dir que, alhora d'obtenir la soca de selecció, el fet de transformar els dos plàsmids necessaris en dues transformacions diferents i no a la vegada augmenta notablement l'eficiència de transformació de la llibreria. Així doncs, en aquest pas es va cultivar la soca de selecció en medi Glu ura-his-, es va procedir a la transformació de 10 µg de la llibreria (1mg/ml) (veure "transformació de llevats") i els llevats resultants van ser incubats a 30°C en plaques de 22cmx22cm Glu ura-his-trp-. En dos o tres dies es van formar colònies de 1-2 mm de diàmetre.

3. SELECCIÓ DELS INTERACTORS POSITIUS.

El següent pas és la selecció dels interactors positius. Aquest pas es va fer mitjançant la replicació de les plaques obtingudes en el pas anterior a plaques de 22cmx22cm de Gal ura-his-trp-leu- X-Gal que van ser incubades a 30°C. En el procés de replicació s'utilitza un replicador i teles de 30cmx30cm. La selecció dels interactors es fa mitjançant la identificació de l'activació de la transcripció dels

reporters LEU2 i lacZ, és a dir, mitjançant la identificació de les colònies leu+ que es tornen blaves en les plaques Gal ura-his-trp-leu- X-Gal.

4. AÏLLAMENT DELS INTERACTORS POSITIUS I.

Les colònies obtingudes en el pas anterior van ser transferides a plaques de 9cmx9cm Glu ura-his-trp- amb un *loop* estèril (~4 a 6 colònies per placa). Un cop crescuts els llevats, aquestes plaques es van replicar en plaques Gal ura-his-trp-leu- X-Gal i Glu ura-his-trp-leu- X-Gal. La funció d'aquest pas és aïllar la colònia que conté el possible interactor i evitar els possibles falsos positius que podrien resultar de picar directament una colònia blava de 1-2mm en una placa amb un gran nombre de colònies. Les colònies que creixen blaves són les que contenen possibles interactores, per tant, cal guardar-les i això es va fer picant cada colònia i sembrant-la en una placa Glu ura-his-trp-, placa anomenada *master plate*. La *master plate* resulta una manera molt còmoda de conservar, en una sola placa, totes les colònies positives resultants del nostre *screening*.

Un cop aïllades les colònies que contenen els interactores positius, cal identificar-los mitjançant l'extracció i seqüenciació del DNA que contenen. Així doncs, es van cultivar les colònies positives de la *master plate* en medi Glu trp- i es va procedir a l'extracció del DNA dels llevats (veure el protocol "extracció de DNA de llevat").

5. AÏLLAMENT DELS INTERACTORS POSITIUS II. Marcatge de colònies bacterianes amb una sonda pjg4-5-específica. Mètode d'hibridació en clorur de sodi/citrat de sodi (SSC).

Cada cèl·lula de llevat on ha tingut lloc un procés d'*Interaction-trap* ha estat transfectada amb tres plàsmids i mitjançant l'extracció del DNA dels llevats els obtenim tots tres; d'aquests, però, només ens interessa un, el pJG4-5, perquè

aquest és el que conté el cDNA de la llibreria. Aquesta és la raó d'aquest pas intermedi després de l'extracció del DNA i abans de la seqüenciació, ja que permet aïllar i identificar únicament els plàsmids pJG4-5 i així disminuir el nombre de mostres per seqüenciar. Aquest procés consisteix en (1) transformació del DNA obtingut de cada colònia de llevat en bacteris DH5 (2) hibridació del DNA bacterià de les colònies obtingudes amb una sonda pJG4-5 específica marcada radioactivament i (3) obtenció del DNA procedent de les colònies bacterianes on la hibridització ha resultat positiva. A continuació es descriu la tècnica emprada en la hibridació del DNA bacterià amb una sonda pJG4-5 específica marcada radioactivament; l'obtenció i marcatge de la sonda específica i la hibridació del DNA bacterià en clorur de sodi/citrat de sodi (SSC).

La sonda pJG4-5 específica utilitzada va ser pJG4-5/*EcoRV*/*EcoRI*, el fragment del plàsmid pJG4-5 (266 bp) comprès entre els llocs de restricció de *EcoRV* i *EcoRI*. Aquesta sonda es va preparar mitjançant digestió amb els enzims de restricció esmentats i purificació i quantificació mitjançant electroforesi en un gel d'agarosa. El marcatge radioactiu es va realitzar amb el kit comercial *Ready To Go* (Amersham Pharmacia Biotech) emprant 25 ng de la sonda desnaturalitzada i 50 µCi de [α^{32} P]cCTP (~3000 Ci/mmol) i seguint les instruccions del fabricant. L'eficiència del marcatge mesurada en un contador de centelleig va ser de 10⁹ cpm/µg.

La hibridització del DNA bacterià en clorur de sodi/citrat de sodi (SSC) es va fer seguint el mètode descrit a la literatura (Suggs et al., 1981; Wallace et al., 1979) i especificat a continuació:

1. Transferència de les colònies bacterianes a membranes de nitrocel·lulosa dipositant la membrana directament sobre la placa de LB-agar durant 1-10". Marcar la membrana asimètricament amb una agulla mullada en tinta xina per a poder saber la orientació en passos posteriors.
2. Col·locar la membrana sobre un paper Whatman 3MM saturat amb Solució Base durant 5'. La membrana es posa amb la cara dels bacteris cap amunt.

3. Transferir la membrana a sobre d'un paper Whatman 3MM saturat amb Solució Neutralitzadora durant 5'.
4. Mullar la membrana amb 2X SSC/SDS 0,1%.
5. Posar la membrana entre dos papers Whatman 3MM i exercir pressió. Assecar la membrana.
6. Autocrosslinkar la membrana amb llum ultraviolada.
7. Mullar la membrana amb 6X SSC.
8. Pre-hibridar la membrana amb Solució de Pre-hibridació a 65°C durant 30'.
9. Hibridar la membrana amb Solució d'Hibridació (Solució de Pre-hibridació amb els 25 ng de sonda marcada) a 65°C durant 2h.
10. Rentar la membrana amb Solució de Rentat. Fer quatre rentats en agitació a TA (~15'/rentat).
11. Assecar la membrana i exposar-la a -80°C entre 2 h i O/N. Visualitzar per autorradiografia.

L'autorradiografia va mostrar que aproximadament una tercera part de les colònies bacterianes screenades contienien el plàsmid pJG4-5, tal i com es podia suposar tenint en compte que els llevats havien estat transfectats amb tres plàsmids diferents.

Solució SSC 20X: NaCl 3 M, citrat de sodi 0,3 M.

Solució Denhardt's 20X: BSA 0,4%, Ficoll MW 400,000 0,4 %, *Polyvinylpyrrolidane* MW 360,000 0,4 %.

Solució de Pirofosfat de sodi 0,2 M

Solució Base: NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M.

Solució Neutralitzadora: Tris base 0,5 M, NaCl 3 M. Ajustar a pH 7,4 amb HCl.

Solució de Pre-hibridació: 6X SSC, 10X Solució Denhardt's, SDS 0,2 %, Tampó fosfat pH 7,0 0,1 M, ss-DNA 50 µg/ml (prèviament bullir el ss-DNA durant 10').

Solució de Rentat: 2X SSC, Solució de pirofosfat de sodi 2,5 mM, SDS 0,2%.

Tampó Fosfat 1 M pH 7,0: 200 ml NaH₂PO₄ (àcid), 300 ml Na₂HPO₄ (base). Ajustar el pH amb la solució corresponent.

6. COMPROVACIÓ DELS INTERACTORS POSITIUS

Un altre pas a fer és la comprovació dels interactors positius, pas que es pot fer prèviament o simultàniament a la seqüenciació. Aquest és un pas necessari per a minimitzar l'obtenció de falsos positius, principal limitació d'aquesta tècnica. El procés va consistir en retransfectar el DNA bacterià obtingut posteriorment a la hibridització, és a dir, els plàsmids pJG4-5 amb els interactors positius, en la soca de llevats original que conté l'esquer i els *reporters* en medi selectiu (soca de selecció). Posteriorment a la transfecció es va repetir el procés de selecció creixent els llevats en plaques Gal ura-his-trp-leu- X-Gal i Glu ura-his-trp-leu- X-Gal. La reproducció del fenotip desitjat (colònies leu+ i blaves en plaques Gal ura-his-trp-leu-) va permetre confirmar la interacció d'alguns dels interactors aïllats.

7. IDENTIFICACIÓ DELS INTERACTORS POSITIUS

El darrer pas per a identificar els interactors de p45^{SKP2} va ser la seqüenciació del DNA obtingut en el pas anterior. Els diferents *primers* emprats en la seqüenciació nucleotídica automàtica van ésser sintetitzats per una casa comercial (GIBCO BRL Life Technologies). La seqüència dels mateixos s'especifica a la taula V.

Taula V.

Nom	Seqüència
PJG45-762-783	5'-GAAATTGAAGCGGATGTTAACG-3'
PJG45-934-913	5'-CAAGGTAGACAAGCCGACAACC-3'

3.2. Transformació de llevats

El protocol utilitzat és una variació del mètode de transfecció d'alta eficiència amb acetat de liti (Ito et al., 1983; Schiestl and Gietz, 1989). Aquest mètode permet obtenir una eficiència de transformació de 10^5 - 10^6 transformants/ μ g.

1. Inocular els llevats en 50ml de medi YPD a 30°C i en agitació (~150 rpm). Créixer O/N fins O.D. 0,333-0,666 ($1,2 \times 10^7$ cèl·lules/ml).
2. Diluir el cultiu en medi YPD nou fins O.D. 0,066 (2×10^6 cèl·lules/ml) i créixer fins O.D. 0,33 (1×10^7 cèl·lules/ml). Aquest pas augmenta considerablement l'eficiència de la transformació.
3. Centrifugar el cultiu a 2000 g durant 5 minuts i descartar el sobrenedant. Rentar les cèl·lules amb aigua bidestil·lada. Aquestes centrifugacions es fan a 20-25°C.
4. Ressuspendre les cèl·lules en aigua bidestil·lada. Transferir a un tub *ependorf*. Fer un rentat amb aigua bidestil·lada. Fer un altre rentat amb 1X LiOAc/TE estèril, fet a partir de stocks estèrils de 10X TE i 10X LiOAc.
5. Ressuspendre els llevats en 1X LiOAc/TE fins O.D. 66,4 (2×10^9 cèl·lules/ml).
6. Afegir 5 μ l de *herring testis carrier DNA* a 10 mg/ml (Clontech), 1 μ g del plàsmid de DNA que ens interessa i 300 μ l d'una solució estèril de PEG 4000 al 40%.

7. Incubar durant 30' a 30°C.
8. Afegir DMSO (*Dimethyl sulfoxide*) fins al 10% vol/vol.
9. Fer un xoc tèrmic a 42°C durant 15' en un bany líquid.
10. Rentar dues vegades amb aigua bidestil·lada.
11. Plaquer en el medi selectiu adequat segons el plàsmid que s'hagi transformat. Incubar a 30°C.

Solució 10X TE: Tris-HCl 0,1 M, EDTA, 0,01 M pH 7.5.

Solució 10X LiOAc: LiOAc 1 M pH 7.5, ajustat amb ac acètic diluït.

Solució PEG 4000 al 40%: PEG 4000 al 40%, 1XTE, 1XLiOAc, fet de stocks estèrils de PEG al 50%, 10XTE i 10XLiOAc.

3.3. Extracció de DNA plasmídic dels llevats

El protocol d'extracció de DNA plasmídic dels llevats es basa en la lisi mecànica dels llevats mitjançant *acid-washed glass beads* (Sigma), unes petites boles de material plàstic. Aquest protocol va ser obtingut de Hoffman et al. (Hoffman and Winston, 1987).

1. Créixer els llevats en 1,5 ml del medi selectiu corresponent en agitació a 30°C O/N.
2. Transferir a tubs *ependorf*.
3. Centrifugar 5". Decantar el sobrenedant i fer un vortex breu del *pellet* per a ressuspèndre'l en el medi restant.
4. Afegir 0,2 ml de la Solució de Lisi, 0,2 ml de Phenol-CHCl₃ (Phenol-CHCl₃-isoamyl alcohol) i 0,3 g de *acid-washed glass beads* (~200 µl de volum).
5. Vortex durant 5'.

6. Centrifugar durant 5'. Transferir la part soluble a un nou tub *eppendorf*.
7. Precipitar la part soluble (3 M NaAc i EtOH 100%. EtOH 70%).
8. Ressuspendre en 20 µl de TE.

Solució de Lisi: SDS 1%, Triton X-100 2%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0.

TE: Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM pH 8,0.

3.4. Assaig líquid per a la mesura de l'activitat β-Galactosidasa

Aquest assaig permet la quantificació de l'activitat enzimàtica β-galactosidasa en cultius líquids de llevats. El mètode utilitzat (Guarente, 1983; Guarente et al., 1980) es basa en la permeabilització o lisi dels llevats i l'addició del substrat cromogènic ONPG (*o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside*). La reacció es para inactivant l'enzim mitjançant l'augment del pH i la formació del producte es determina espectrofotomètricament.

1. Créixer els llevats en 5 ml del medi selectiu adequat fins O.D. 0,6.
2. Separar mostres de 0,1 ml i 1 ml del cultiu i diluir el cultiu restant en 2 volums del Tampó Z.
3. Centrifugar durant 2'.
4. Ressuspendre el *pellet* en 1 ml de Tampó Z.
5. Afegir dues gotes de CHCl₃ i una gota de SDS 0,1%.
6. Vortex durant 10".
7. Pre-escalfar les mostres a 28°C durant 2'.
8. Afegir 0,2 ml de Solució de ONPG pre-escalfat. Incubar a 28°C. Mesurar el temps que tarda cada mostra en tornar-se de color groc clar.

9. Afegir 0,5 ml de Na₂CO₃ 1 M a cada mostra que es torni groga per a aturar la reacció.
10. Transferir a tubs *ependorf*i centrifugar 5' per eliminar el CHCl₃ i les restes cel·lulars.
11. Mesurar la O.D.₄₂₀ de les mostres obtingudes en el pas 11 i la O.D.₆₀₀ de les mostres obtingudes en el pas 2.
12. Calcular les unitats de β-galactosidasa de cada mostra amb la següent fórmula.

$$\text{Unitats} = 1000 \times (\text{O.D.}_{420} / (t \times V \times \text{O.D.}_{600}))$$

on t= temps en minuts i V= volum del cultiu utilitzat (0,1 o 1 ml)

Tampó Z: Na₂HPO₄ 7H₂O 0,06 M, NaH₂PO₄ H₂O 0,04 M, KCl 0,01 M, MgSO₄ 7H₂O 0,001 M, β-mercaptoetanol 0,05 M, ajustat a pH 7.0).

Solució de ONPG: 4 mg/ml de *o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside*, NaPO₄ 0,1 M pH 7.0)

3.5. Medis de cultiu

La composició dels medis de cultiu per llevats és la que figura clàssicament a la literatura (Ausubel et al., 1987-1994). La majoria dels medis de cultiu de llevats s'utilitzen tant en forma líquida com en forma sòlida en plaques de petri. La diferència de composició entre les dues formes és únicament que en la forma líquida no hi ha agar ni *pellet* de NaOH.

Plaques de *MEDI DROPOUT* (per 1 litre):

1,4 g YNB (*yeast nitrogen base*) sense aminoàcids ni sulfat d'amoni (GibcoBRL)

5 g (NH₄)SO₄ (Sigma)

0,6 g -His/-Leu/-Trp/-Ura DO supplement (Clontech)

1 *pellet* de NaOH (~0,1 g)

20 g agar (Difco Bacto-agar, Difco)

Barrejar en aigua bidestil·lada i autoclavar

Afegir glucosa a concentració final 2%

Afegir 10 ml de la solució 100X de l'aminoàcid amb el que no volem seleccionar (Sigma)

Aquest medi conté base nitrogenada, un sucre com a font de carboni i una barreja de nutrients dels quals se n'eliminen un o més segons el plàsmid que volem seleccionar. La concentració de nutrients presents en el medi *Dropout* es mostra a continuació:

Nutrient	Concentració final (µg/ml)
Adenina	40
L-arginina	20
L-àcid aspàrtic	100
L-àcid glutàmic	100
L-histidina (his)	20
L-isoleucina	30
L-leucina (leu)	60
L-lissina	30
L-metionina	20
L-fenilalanina	50
L-serina	375
L-treonina	200

L-triptòfan (trp)	40
L-tirossina	30
L-valina	150
Uracil (ura)	20

Plaques de MEDI YPD (per 1 litre):

10 g extracte de llevat (Yeast extract Servabacter, Serva)

20 g peptona (Difco Bacto-peptone, Difco)

1 *pellet* NaOH (~0,1 g)

20 g agar (Difco Bacto-agar, Difco)

Barrejar en aigua bidestil·lada i autoclavar

Afegir glucosa a concentració final 2%

Plaques X-Gal (per 1 litre):

1,4 g YNB sense aminoàcids ni sulfat d'amoni (GibcoBRL)

5 g (NH₄)SO₄ (Sigma)

0,6 g –His/-Leu/-Trp/-Ura DO supplement (Clontech)

1 *pellet* de NaOH (~0,1 g)

20 g agar (Difco Bacto-agar, Difco)

Barrejar en aigua bidestil·lada i autoclavar

Afegir glucosa/galactosa a concentració final 2%

Afegir 100 ml d'una solució NaPO₄ 1 M (Na₂HPO₄ 1 M i NaH₂PO₄ H₂O 1 M, pH 7.0)

Afegir 2 ml d'una solució 20 mg/ml de X-Gal dissolta en dimetilformamida

4. Tècniques bioquímiques i de biologia cel·lular

4.1. Detecció de l'expressió proteica

Electroforesi de proteïnes en gel amb SDS (SDS-PAGE) i detecció de proteïnes mitjançant tinció

L'electroforesi de proteïnes en minigels de poliacrilamida amb SDS (*sodium dodecyl sulfate*) es va utilitzar com a mètode estàndard de separació de mostres proteiques en condicions desnaturalitzants seguint la tècnica de Laemmli (Laemmli, 1970). Com a material per a fer l'electroforesi es va utilitzar el *Mini-Protean System* (Bio-Rad Laboratories) seguint les instruccions del fabricant.

Tampó 4X Tris-HCl/SDS pH 6,8: Tris-HCl 0,5 M, SDS 0,4%. pH 6,8.

Tampó 4X Tris-HCl/SDS pH 8,8: Tris-HCl 1,5 M, SDS 0,4%. pH 8,8.

Solució d'acrilamida 45%: acrilamida 21,9%, bisacrilamida 0,6%.

Gel separation 8%: 6 ml tampó 4X Tris-HCl/SDS pH 8,8, 4,3 ml Solució d'acrilamida 45%, 13,7 ml H₂O bd, 70 µl Persulfat d'amoni 10%, 25 µl Temed.

Gel stacking 4,5%: 2,5 ml Tampó 4X Tris-HCl/SDS pH 6,8, 1 ml Solució d'acrilamida 45%, 6,5 ml H₂O bd, 50 µl Persulfat d'amoni 10%, 15 µl Temed.

Tampó de càrrega reductor: SDS 2%, glicerol 10%, 2-βmercaptoetanol 5%, Tris-HCl 62 mM pH 6,8, blau de bromofenol 0,001%.

Tampó utilitzat en l'electroforesi: Tris-base 0,3%, glicina 1,44%, SDS 0,1%.

El percentatge d'acrilamida del gel depèn del rang de pes molecular que interressi visualitzar (5% per 60-200 KD, 10% per 16-70 KD i 15% per 12-45 KD).

La detecció de proteïnes s'ha fet mitjançant tinció i mitjançant Western-blot.

Una tinció molt sensible aplicable tant al gel com a la major part de tipus membranes és el Blau de Coomassie (permet deteccions per sobre de 50 ng/banda), tinció, però, irreversible. La tinció es realitza emprant primer la Solució Coomassie Blue i després la Solució destenyidora Coomassie Blue. La tinció Vermell Ponceau aplicada a les membranes és menys sensible (permet deteccions superiors a 200 ng/banda) però és reversible.

Solució Coomassie Blue R-250: Coomassie blue 0,2%, Metanol 45%, Ac. Acètic 10%.

Solució destenyidora Coomassie Blue R-250: metanol/isopropanol 30%, Ac. Acètic 10%.

Solució Vermell Ponceau : Ponceau S 0,5%, Ac. Acètic 1%, 200 µM NaOH.

Detecció de proteïnes mitjançant Western-blot

L'Immunoblot o Western-blot es va utilitzar per a identificar proteïnes específiques reconegudes per anticossos monoclonals o policlonals, seguint el protocol descrit a la literatura (Towbin et al., 1979).

1. Solubilitzar els lisats o precipitats en un tampó que conté SDS i en la majoria dels cassos agents reductors com 2-ME (2-mercaptoetanol).
2. Separar el material proteic mitjançant SDS-PAGE.
3. Transferir electroforèticament a una membrana de PVDF (*polyvinylidene difluoride*) (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech) manipulada seguint les instruccions del fabricant.
4. Incubar la membrana amb un anticòs específic per la proteïna que es vol detectar. La quantitat d'anticòs emprada depèn d'aquest, és diferent en cada cas i cal estandarditzar-la en Immunoblots previs. En cas necessari, bloquejar la membrana per evitar inespecificitats. Rentar la membrana amb TTBS, 3

rentats en agitació durant 10'.

5. Incubar la membrana amb un segon anticòs que reacciona amb els complexos proteïna-anticòs de la membrana. El segon anticòs està conjugat a l'enzim HRPO (*horseradish peroxidase*). Rentar la membrana amb TTBS, 3 rentats en agitació durant 10'.

6. Visualitzar l'activitat enzimàtica mitjançant quimioluminescència, utilitzant el reactiu ECL (*Enhanced Chemiluminescence reagent*) (Amersham Pharmacia Biotechnology) i seguint les instruccions del fabricant.

Tampó de transferència: Tris-Acetat 20 mM, SDS 0,1%, isopropanol 20%.

TTBS: Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%.

Solució de bloqueig: TTBS amb BSA (bovine serum albúmina) 5%.

Solució on es dilueixen els anticossos: TTBS amb BSA 1%.

4.2. Expressió i purificació de proteïnes de fusió en *E. coli*

Expressió i purificació de la proteïna de fusió His-CksHs1 en *E. coli*

El sistema d'expressió proteica utilitzat per a expressar la proteïna de 9 KD CksHs1 en *E. coli* va ser el sistema del promotor de la RNA polimerassa T7. El fragment de 249 aminoàcids codificant de la seqüència completa de CksHs1 es va subclonar en el vector pSRETb, el qual conté el promotor de la RNA polimerassa T7. Es van utilitzar bacteris *E. coli* BL21 (DE3), les quals contenen en el seu cromosoma el gen de la RNA polimerassa T7 sota el control del promotor lac (Studier and Moffatt, 1986; Studier et al., 1990) la qual cosa permet la inducció de la seva expressió utilitzant IPTG. Prèviament a la inducció i purificació proteica a gran escala es van fer experiments a petita escala per a comprovar l'adequada inducció i expressió de la proteïna. El protocol seguit per a la inducció i expressió proteica a gran escala va ser el següent:

1. Transformar en bacteris BL21 (DE3) el vector d'expressió pSRETB en el qual s'ha subclonat el fragment de DNA codificant de la proteïna d'interès (veure “transformació de bacteris per xoc tèrmic”)
2. Cultivar una colònia dels bacteris resultants en 25 ml de LB i ampil·lina (2 µl/ml de LB d'una solució d'ampil·lina de 100 µg/ml). Cultivar O/N a 37°C en agitació.
3. Diluir el cultiu en 1 litre de LB+ampil·lina i créixer en les mateixes condicions fins a O.D.₆₀₀ 0,8.
4. Induir l'expressió de la proteïna de fusió afegint IPTG a una concentració final de 1 mM. Cultivar a 30°C durant 4-5 h.
5. Transferir el cultiu a tubs i centrifugar a 6000 rpm durant 15' a 4°C. Descartar el sobrenedant i resuspendre el *pellet* en 20 ml del Tampó d'extracció.
6. Lisar les cèl·lules mitjançant sonicació (afegint PMSF a concentració final 1 mM just abans de la sonicació). Centrifugar a 10000 rpm durant 15' a 4°C per eliminar la part insoluble. Transferir el sobrenedant a nous tubs.

Un cop obtingut el lisat bacterià que conté la proteïna d'interès, es va procedir a la purificació. El sistema de purificació emprat va ser IMAC (*Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*) (Hemdan and Porath, 1985; Porath, 1985; Sulkowski, 1985; Zhao et al., 1991). Aquesta tècnica es basa en la interacció reversible entre les cadenes laterals de diversos aminoàcids i ions immobilitzats de metalls. Les cadenes laterals de histidina s'han implicat en la interacció amb cobalt en determinades condicions de pH. Així, la utilització d'una resina amb cobalt va permetre unir la proteïna de fusió His-CksHs1 i canvis en el pH o la concentració d'imidazol van permetre eluir-la. Es va utilitzar la resina *TALON Metal Affinity Resin* (Clontech Laboratories) seguint les instruccions del fabricant. La determinació de les concentracions d'imidazol tant en el Tampó d'extracció com en el Tampó d'elució van ser determinades empíricament en assajos previs d'expressió i purificació d'aquesta proteïna a petita escala. A continuació es detalla

el protocol seguit en la purificació.

7. Equilibrar 1 ml de resina TALON mitjançant dos rentats amb 5 ml de Tampó d'extracció.
8. Afegir el lisat obtingut en el pas 6 a la resina. Incubar en nòria durant 30' a 4°C.
9. Rentar dues vegades amb 10 ml de Tampó d'extracció. Els rentats es fan en nòria durant 10' a 4°C.
10. Ressuspendre la resina en 500 µl de Tampó d'extracció i fer un vortex. Transferir la resina ressuspesa a una columna (Bio-Rad Laboratories) i fer dos rentats amb 2,5 ml de Tampó d'extracció amb imidazol (la concentració final de l'imidazol en aquest tampó és 50 mM).
11. Eluir el contingut de la resina amb 2,5 ml del Tampó d'elució. Analitzar la proteïna His-CksHs1 mitjançant un Immunoblot anti-CksHs1 i quantificar-la mitjançant espectrofotometria. La resina pot ésser re-utilitzada.

Tampó d'extracció: fosfat de sodi 50 mM, NaCl 300 mM. Ajustar a pH 7,0.

Tampó d'elució: fosfat de sodi 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 150 mM. Ajustar a pH 7,0.

Expressió i purificació de la proteïna de fusió GST-p21^{Cip1} en *E. coli*

Per a l'expressió i purificació en *E. coli* de la proteïna p21^{Cip1} es va emprar el sistema d'expressió i purificació de proteïnes de fusió amb GST (*Glutathione-S-Transferase*) (Ausubel et al., 1987-1994). Aquest sistema utilitza els vectors pGEX, els quals permeten l'expressió de proteïnes en *E. coli* en una forma que permet la seva ràpida purificació en condicions no desnaturalitzants. Així, la proteïna d'interès s'expressa com a una proteïna de fusió amb GST, proteïna citoplasmàtica de 26 KDa present en eucariotes, en el seu extrem carboxi-terminal. L'expressió de la proteïna de fusió és induïda per IPTG. Les proteïnes de fusió normalment

es troben en forma soluble dins els bacteris i poden ser purificades dels lisats bacterians per l'afinitat de la GST per glutatió, el qual es troba en un suport d'agarosa. La recuperació de la proteïna de fusió en aquests cassos es porta a terme mitjançant elució amb glutatió reduït. A vegades les proteïnes de fusió així produïdes romanen insolubles en el lisat bacterià i no es poden purificar emprant glutatió-sepharose®. En aquests cassos cal solubilitzar-les i purificar-les amb un sistema diferent, per exemple, electroelució.

Prèviament a la inducció i purificació proteica a gran escala es van fer experiments a petita escala per a comprovar la solubilitat i l'adequada producció de la proteïna. La proteïna de fusió GST-p21^{Cip1} així produïda i analitzada mitjançant SDS-PAGE va resultar insoluble. La inducció de l'expressió de p21^{Cip1} en bacteris *E. coli* es va fer seguint el protocol següent (Ausubel et al., 1987-1994).

1. Transformar en bacteris DH5 el vector d'expressió pGEX en el qual prèviament s'ha subclonat el fragment de cDNA codificant de la proteïna d'interès (veure “transformació de bacteris per xoc tèrmic”)
2. Cultivar una colònia dels bacteris resultants en 100 ml de LB i ampicil·lina (2 µl/ml de LB d'una solució d'ampicil·lina de 100 µg/ml). Cultivar O/N a 37°C en agitació.
3. Diluir el cultiu en 1 l de LB+ampicil·lina i créixer en les mateixes condicions fins a O.D.₆₀₀ ~0,6
4. Induir l'expressió de la proteïna de fusió afegint IPTG a una concentració final de 0,3 mM. Cultivar a 37°C durant 2-3 h.
5. Transferir el cultiu a tubs i centrifugar a 9000 rpm durant 15' a 4°C. Descartar el sobrenedant i fer vortex per a ressuspèndre els *pellets*. Rentar els *pellets* amb TBS. Pesar els *pellets*. Guardar mostres dels bacteris induïdes per a controls posteriors.
6. Lisar les cèl·lules mitjançant sonicació Centrifugar a 12000 rpm durant 15'

a 4°. Descartar el sobrenedant i ressuspendre el *pellet* en H₂O bd (1 ml/g de bacteris). Guardar mostres dels lisats insolubles per a controls posteriors.

7. Comprovar la correcta inducció de la proteïna i la seva presència en la part insoluble del lisat bacterià mitjançant SDS-PAGE.

Seguidament es va procedir a la purificació proteica. Donat que la anàlisi del lisat bacterià mitjançant SDS-PAGE va mostrar que la proteïna GST-p21^{Cip1} era insoluble, es va procedir a la seva purificació mitjançant electroelució (Hunkapiller and Lujan, 1986). La realització d'aquest procés va incloure la separació de la mostra proteica mitjançant SDS-PAGE 10% en un gel de grans dimensions. Posteriorment es va procedir a la tinció del gel amb KCl i a l'escissió de la banda corresponent a la proteïna d'interès GST-p21^{Cip1} de pes molecular 47 KDa. Seguidament, la proteïna tenyida va ser eluïda electroforèticament del gel. Després, la proteïna va ser dialitzada en PBS. Finalment la proteïna va ser quantificada mitjançant SDS-PAGE i identificada mitjançant Western-blot. A continuació es detalla el procés següent:

8. Els lisats bacterians insolubles es van ressuspendre en Tampó de càrrega reductor i es van resoldre mitjançant SDS-PAGE. El gel resultant es va tenyir amb una solució de KCl. Una petita mostra del gel es va tenyir amb Coomassie Blue per a identificar clarament la proteïna.

9. El gel tenyit amb KCl es va tallar en trossos ~1 mm³ amb un bisturí estèril.

10. L'electroelució es va dur a terme emprant l'aparell de electroelució *Biotrap* BT 1000* (Schleicher & Schuell) i seguint les instruccions del fabricant. El procés es va dur a terme amb una membrana de diàlisi *Dialysis Tubing - Visking Size 2 Inf Dia 18/32" – 14.3 mm: 30 M* (Medicell International Ltd) i a TA. Les condicions de l'electroforesi van ser 200 V durant 4-5 h i es va utilitzar el tampó normalment usat en l'SDS-PAGE. El bon funcionament del procés d'elució es va comprovar durant l'electroforesi mitjançant la tinció dels petits fragments del gel amb Coomassie Blue. Finalitzat el procés es va comprovar el contingut proteic de la mostra eluïda mitjançant el colorant proteic *Coomassie*

Plus Protein Assay Reagent (Pierce). Es va mesurar el pH de la mostra eluïda i es va ajustar a pH 7,0 amb Tris-HCl 1 M pH 8,0.

11. Les mostres proteiques es van dialitzar canviant així el Tampó d'electroelució on estava la proteïna per PBS. La diàlisi es va dur a terme de manera estàndard emprant una membrana de diàlisi *Dialysis Tubing - Visking Size 2 Inf Dia 18/32" – 14.3 mm: 30 M* (Medicell International Ltd) i realitzant el procés a 4°C en agitació durant 24 h.

12. El producte obtingut va ser analitzat mitjançant SDS-PAGE i Western-blot utilitzant un anticòs policlonal de conill anti-p21^{Cip1} humà. El producte obtingut va ser quantificat emprant proteïna BSA (bovine serum albumina) de concentració coneguda i mitjançant SDS-PAGE i espectrofotometria. El resultat del procés va ser la obtenció de ~3 mg/ml de proteïna GST-p21^{Cip1}.

TBS: Tris-HCl pH 7,4 10 mM, NaCl 140 mM.

Solució de KCl: KCl 0,25 M.

4.3. Expressió de proteïnes de fusió en eucariotes

Transfecció de cèl·lules Cos-7 (Mètode DEAE-Dextran)

En diversos experiments d'aquest estudi s'ha utilitzat la transfecció de cèl·lules amb DEAE-Dextran (Sambrook et al., 1989). Aquesta tècnica permet introduir diversos plàsmids d'expressió en la línia cel·lular Cos-7 amb la finalitat d'obtenir l'expressió transitòria de les proteïnes d'interès en l'esmentada línia cel·lular. El DNA codificant de les proteïnes d'interès va ser subclonat en diversos plàsmids d'expressió i amplificat utilitzant bacteris. Els plàsmids resultants van ser introduïts en la línia cel·lular Cos-7 seguint el procediment que es detalla a continuació.

1. Cultivar O/N la línia cel·lular en medi de cultiu RPMI (10%FCS) (GIBCOBRL) utilitzant plaques de cultiu de mida adequada a la quantitat de

cèl·lules necessàries. En els diferents experiments realitzats es van utilitzar plaques de cultiu de 6 pous (9 cm²/pou) (2x10⁵ cèl·lules) i plaques de petri de cultiu de 20cm² (4x10⁵ cèl·lules) i 63cm² (1x10⁶ cèl·lules). Les quantitats esmentades en els següents passos son referides a les plaques de cultiu de 6 pous, en els altres cassos les quantitats son proporcionals.

2. Rentar les cèl·lules amb PBS estèril.
3. Barrejar les solucions A+B i afegir-les a les cèl·lules (concentració final: Cloroquina 1x, DEAE-Dextran 0,4mg/ml).
4. Incubar durant 4h.
5. Afegir ~1 ml de 10%DMSO en PBS. Incubar 2'.
6. Rentar les cèl·lules amb PBS estèril.
7. Afegir 10 ml de RPMI (10%FCS).

El temps de cultiu de les cèl·lules transfectades depèn de la tècnica a realitzar posteriorment. A partir de 24h es pot realitzar un marcatge *in vivo*, en canvi, el temps d'espera adequat per a fer lisats i (co)immunoprecipitacions és de 48-72h.

Solució A: 0,5 ml RPMI (2%FCS) + ~2 µg DNA.

Solució B: 0,5 ml RPMI (2%FCS) + 10 µl Cloroquina 100x (concentració final 2x) (solució stock de Cloroquina 100x: 10 mM en PBS) + 4 µl DEAE-Dextran (concentració final 0,8 mg/ml) (solució stock 100 mg/ml en H₂O).

10X PBS: NaCl 1,37 M, KCl 27 mM, Na₂HPO₄·7H₂O 43 mM, KH₂PO₄ 14 mM. Ajustar el pH a 7,3 +/- 0,1.

4.4. Lisi de cèl·lules i precipitació de proteïnes

Es van realitzar assajos de coprecipitació amb lisats de cèl·lules Cos-7 transfectades amb diversos constructs i assajos de coimmunoprecipitació amb lisats de cèl·lules Cem i Jurkat. La quantitat de cèl·lules lisades és 2x10⁵ cèl·lules

Cos-7 per cada condició i 150x10⁶ cèl·lules Cem i Jurkat per cada condició. Les cèl·lules es van rentar amb PBS i es van lisar amb un tampó que contenia NP-40 (1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5 i 1 mM EDTA), 1 mM de PMSF (*phenylmethylsulfonyl fluoride*) i inhibidors de proteases (*protease inhibitor cocktail complete*) (Boehringer Mannheim). El material insoluble es va eliminar dels lisats mitjançant centrifugació amb una microcentrífuga. Els lisats van ser analitzats per SDS-PAGE o precipitats utilitzant diferents anticossos i proteïna A-sepharose® (Amersham Pharmacia Biotech) o glutatió-sepharose® (Amersham Pharmacia Biotech). Els precipitats es van rentar amb el tampó corresponent (0,1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl i 50 mM Tris-HCl pH7,5). Posteriorment es van analitzar els precipitats amb el Western-blot corresponent.

4.5. Assaig de quinasses de CDK2

Els diversos assajos de quinasses es van dur a terme en cèl·lules Cos-7 expressant CDK2 exogen, després de lisar-les i de la precipitació del CDK2. La reacció de quinasses es va fer incubant els precipitats a 30°C durant 10' en presència de 100 µCi (10 µl) de [γ^{32} P]ATP (~3000 µCi/mmol) i 20 µg d'histona H1 (2 mg/ml) utilitzant el *CDK1/Cdc2 kinase kit* (Upstate Biotechnology) i seguint les instruccions del fabricant. Els precipitats resultants van ser analitzats per SDS-PAGE en condicions reductores, transferits a una membrana de PVDF (*polyvinil difluoride*) (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech) i visualitzats per autoradiografia a les 6-12h.

4.6. Immunohistoquímica

Es van utilitzar tècniques de fluorescència directa i d'immunofluorescència indirecta en cèl·lules de mamífer Cos-7 per a determinar la localització cel·lular de les proteïnes estudiades, així com per a avaluar canvis de localització en experiments de cotransfecció de dues proteïnes. Els experiments de fluorescència

directa es van fer transfectant cèl·lules Cos-7 amb plàsmids d'expressió codificants de proteïnes de fusió entre la proteïna d'interès i la proteïna GFP (*green fluorescent protein*). La proteïna de 27 KDa GFP és originària de *Aequoria victoria* i es va utilitzar com a *tag* fluorescent (Ludin et al., 1996; Marshall et al., 1995; Rizzuto et al., 1995; Wang and Hazelrigg, 1994). En els experiments d'immunofluorescència indirecta es va emprar l'anticòs monoclonal anti-myc 9E10 com a anticòs primari i l'anticòs *anti-mouse IgG TRITC Conjugate* com a anticòs secundari.

En el cas de la immunofluorescència indirecta va ser necessari fixar, permeabilitzar i incubar les cèl·lules amb anticossos primaris i secundaris. En el cas de la fluorescència directa, no va ser necessari permeabilitzar les cèl·lules i els cobreobjectes es van muntar en els portaobjectes després de la fixació. La tècnica emprada va ser la següent (Serra-Pages et al., 1995):

1. Transfectar cèl·lules Cos-7 amb plàsmids d'expressió codificants de proteïnes de fusió entre les proteïnes d'interès i la proteïna GFP o el *tag* myc, segons convingui. A les 24h de la transfecció les cèl·lules es tripsinitzen i es cultiven O/N en plaques de 24 pous que contenen cobreobjectes de vidre circulars de 12mm de diàmetre. L'augment d'adherència de les cèl·lules al vidre s'aconsegueix amb el tractament previ dels cobreobjectes amb *poly-L-lysine* 0.01% O/N (Sigma).
2. Rentar les cèl·lules amb PBS (*phosphate buffered saline*, pH 7,2-7,4) dues vegades.
3. Fixar les cèl·lules mitjançant el tractament amb una solució de paraformaldehid 2% en PBS durant 15' a TA.
4. Rentar les cèl·lules amb PBS dues vegades.
5. Permeabilitzar les cèl·lules amb una solució de Tritó TX-100 0,1% en PBS durant 10' a TA.
6. Rentar les cèl·lules amb PBS dues vegades.
7. Incubar amb l'anticòs primari anti-myc 9E10 (5µg/ml) dissolt en Solució

de bloqueig. Incubar durant 30' a TA.

8. Rentar amb PBS dues vegades de manera ràpida i una tercera vegada durant 15'.

9. Incubar amb l'anticòs secundari *anti-mouse IgG TRITC Conjugate* (1/400) dissolt en Solució de bloqueig. Incubar durant 30' a TA.

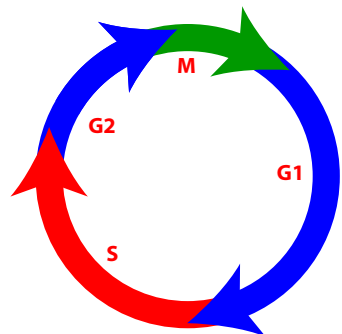
10. Rentar amb PBS dues vegades de manera ràpida i una tercera vegada durant 15'.

11. Muntar els cobreobjectes en portaobjectes amb Solució de muntatge. Deixar assecar els cobreobjectes i guardar-los en un lloc fosc.

Solució de bloqueig: PBS amb sèrum de conill inactivat 10%.

Solució de muntatge: Vinol 205 15% p/v, glycerol 33% v/v i azida 0,1% en PBS.

IV. RESULTATS



1. p45^{SKP2} interacciona amb CksHs1

Per a identificar noves proteïnes que interaccionen amb p45^{SKP2} es va utilitzar el sistema *Interaction-trap*, un tipus de sistema *two-hybrid* (Gyuris et al., 1993). El cDNA codificant de p45^{SKP2} (aminoàcids 3-436) es va clonar en el plàsmid pEG202 per a crear l'esquer LexA-p45^{SKP2}. Aquest plàsmid es va transformar en la soca de llevats EGY048, la qual conté els gens reporter LEU2 i lacZ sota el control de l'operó LexA. Aquesta soca de llevat no va poder ésser finalment utilitzada per a l'*Interaction-trap* perquè l'esquer LexA-p45^{SKP2} és un activador basal de la transcripció en aquesta soca. Per a solucionar aquest problema l'esquer LexA-p45^{SKP2} es va transformar en la soca de llevat EGY191, la qual és menys sensible donada la presència d'un operador de LEU2 enlloc de tres. Amb la soca de llevat resultant es van realitzar diversos *screenings* o *Interactor-hunts* utilitzant dues llibreries diferents i augmentant així la possibilitat de trobar interactors. Les dues llibreries utilitzades van ser *Human Lymphocyte Matchmaker Lex cDNA Library*, una llibreria de limfòcits humans, i una llibreria de cèl·lules HeLa. Aquestes llibreries permeten l'expressió condicional de proteïnes de fusió del domini d'activació B42 amb les proteïnes pròpies de cada llibreria.

La soca de llevat amb l'esquer introduït es va transformar amb la llibreria corresponent en cada cas. Un cop fet l'*screening* d'aproximadament un milió de transformants independents de cada llibreria, es van aïllar les clones portadores del fenotip desitjat; és a dir, Leu+ i lacZ+ en condicions de creixement utilitzant galactosa, però no glucosa. El cDNA de a cada una de les clones obtingudes va ser seqüenciat en direcció 5' amb el primer pJG4-5-762-783 i la seqüència obtinguda va ser analitzada utilitzant les bases de dades habituals (*NCBI non-redundant Genbank CDS translations+ PDB+ SwissProt+ PIR+ PRF, NCBI Pubmed*). Paral·lelament, el cDNA de les clones positives obtingudes es va retransformar en la soca original portadora de l'esquer i es va repetir el procés de selecció per a comprovar els interactors positius.

Es van realitzar tres *screenings* de p45^{SKP2}, dos d'ells amb la llibreria de limfòcits

humans i l'altre amb la llibreria de cèl·lules HeLa. La mitja de clones obtingudes portadores del fenotip desitjat va ser de 30 per cada *screening*. Una quarta part d'aquestes, aproximadament, van resultar positives un cop feta la retransformació de les clones en la soca original portadora de l'esquer. Per tant, les clones positives, retransformades i amb resultat també positiu, van ser una mitja de 8 clones per *screening*. La seqüència i anàlisi dels cDNAs corresponents a les clones definitivament positives va evidenciar la presència de diferents tipus de clones; (1) clones corresponents a interaccions ja descrites (2) clones corresponents a interaccions no descrites (3) clones codificants de diferents fragments de la mateixa proteïna i (4) clones considerades falsos positius i, per tant, resultats no valorables en els *screenings*. Les taules VI, VII i VIII resumeixen els resultats més importants obtinguts en els tres *screenings* de p45^{SKP2}. Els resultats mostrats a les taules no son exhaustius però constitueixen una mostra representativa dels resultats que s'obtenen en aquest tipus de tècnica. En les tres taules s'especifiquen

Taula VI.

Clona	Identificació	Fragment
49.40	KIAA1517	
50.41	p19 ^{SKP1}	163bp-(aa19-)
56.54	p19 ^{SKP1}	190bp-(aa28-)
61.3	p19 ^{SKP1}	163bp-(aa19-)
66.73	p19 ^{SKP1}	151bp-(aa15-)
54.50	CksHs1	68bp-(aa19-)
57.55	CksHs1	68bp-(aa19-)

Resultat del primer *screening* de p45^{SKP2} realitzat amb una llibreria de limfòcits humans. En l'*screening* es van obtenir 32 clones amb el fenotip Leu+ lacZ+, però només 7 clones es van confirmar com a interactors mitjançant re-transformació dels cDNAs en la soca de llevat original portadora de l'esquer. Aquest resultat identifica p19^{SKP1} i CksHs1 com a possibles interactors de p45^{SKP2}. La seqüència KIAA1517 representa un motiu putatiu per a una RNA helicasa depenent d'ATP, però es considera un fals positiu i no és un resultat valorable.

Taula VII.

Clona	Identificació	Fragment
25.43	p19 ^{SKP1}	147bp-(aa14-)
28.49	Clona AF184110	
30.53	p19 ^{SKP1}	216bp-(aa37-)
34.61	Ciclofilina A	(part no traduïda 3')
37.67	GATE-16GEF2	42bp-(aa1-)
38.69	Proteïna ribosòmica L7 (60S)	
40.73	HSI01721	
44.81	DYT1	(cadena antiparal·lela)
46.85	SnRNP (polipèptid B)	(marc erroni)

Resultat del segon *screening* de p45^{SKP2} realitzat amb una llibreria de limfòcits humans. En l'*screening* es van obtenir 30 clones amb el fenotip Leu+ lacZ+, però només 9 clones es van confirmar com a interactors en la re-transformació. La seqüenciació i anàlisi posteriors van evidenciar que molts d'ells eren falsos positius. La clona 28.49 correspon a AF184110, una regió intrònica (41750bp-) del gen codificant de NKTR (*Homo sapiens cyclophilin-related protein*). La clona 34.61 correspon a una zona no traduïda del gen codificant de la Ciclofilina A. La clona 38.69 correspon a la proteïna ribosòmica L7, component de la subunitat 60S i freqüent fals positiu en aquesta tècnica. La clona 40.73 correspon a HSI01721, fragment de DNA genòmic que no presenta homologia amb cap proteïna coneguda. La clona 44.81 correspon a la cadena antiparal·lela del cDNA codificant de la Torsina A. La clona 46.85 correspon a la seqüència codificant d'un fragment d'una ribonucleoproteïna però amb un marc de lectura equivocacat. Per tant, el resultat d'aquest *screening* mostra com a possibles interactors les proteïnes anomenades p19^{SKP1} i GATE-16^{GEF2} (*Golgi-associated ATPase Enhancer of 16 KDa*).

els noms que es van donar a les clones de llevats i bacteris abans de seqüenciar-les, la identificació de les clones un cop seqüenciades i analitzades i el lloc d'inici del fragment corresponent a cada clona aïllada respecte a la seqüència completa dels cDNAs que codifiquen.

En tots els *screenings* realitzats es van identificar clones corresponents a diferents fragments del cDNA codificant de la proteïna p19^{SKP1}, incloent el mateix cDNA *full-length* codificant de la seqüència completa de la proteïna (153 aa). La interacció directa de p19^{SKP1} amb p45^{SKP2} està descrita a la literatura (Zhang et al.,

Taula VIII.

Clona	Identificació	Fragment
31.62	p19 ^{SKP1}	64bp-(aa1)
45.89	RAB5-IP	160bp-(aa1-)
47.93	p19 ^{SKP1}	64bp-(aa1-)
48.95	CksHs1	2bp-(aa1-)
49.97	CksHs1	12bp-(aa2-)
55.109	MPP11	(part no traduïda 3')
59.114	CksHs1	12bp-(aa2-)

Resultat del tercer *screening* de p45^{SKP2} realitzat amb una llibreria de cèl·lules HeLa. En l'*screening* es van obtenir 29 clones amb el fenotip Leu+ lacZ+, però només 7 clones es van confirmar com a interactors en la re-transformació. La clona 55.109 correspon a una zona no traduïda del gen codificant de la fosfoproteïna de fase S MPP11 (*M phase phosphoprotein*), i com a tal, aquesta clona va ser considerada un fals positiu. Aquest *screening* va permetre identificar com a possibles interactors les proteïnes p19^{SKP1}, RAB5-IP (*RAB5-interacting protein*) i CksHs1.

1995) i l'estructura cristal·lina del complexe p19^{SKP1}/p45^{SKP2} ha estat recentment descrita (Schulman et al., 2000). En el present estudi, la interacció p19^{SKP1}-p45^{SKP2} va ser utilitzada en posteriors experiments d'*Interaction-trap* com a control positiu, ja que és una interacció ben descrita a la literatura i reproducible en el nostre model experimental.

CksHs1 va ser una altra proteïna identificada com a interactor de p45^{SKP2} en els *screenings* realitzats tant amb la llibreria de limfòcits com amb la llibreria de cèl·lules HeLa. Es van identificar diferents fragments del cDNA codificant de la proteïna, inclòs el cDNA *full-length* codificant de la seqüència completa de la proteïna (73 aa). Una de les clones identificades codificava els aminoàcids 19-79 de la proteïna CksHs1. Està descrit que p45^{SKP2} i CksHs1 formen part del complexe multiproteic de Ciclina A/CDK2 (Zhang et al., 1995) però en el moment de fer aquest *screening* la seva interacció directa proteïna-proteïna no havia estat descrita.

Dues de les clones trobades codifiquen per gens descrits però no relacionats

fins ara amb el cycle cel·lular ni amb p45^{SKP2}. Una d'aquetes proteïnes s'anomena GATE-16 (*Golgi-associated ATPase Enhancer of 16 KDa*) (Paz et al., 2000; Sagiv et al., 2000) o GEF2 (Legesse-Miller et al., 1998) i va ser aïllada de la llibreria de limfòcits humans. La seqüència corresponent a l'altra proteïna correspon a la clona c-89 i va ser aïllada de la llibreria de cèl·lules HeLa. Aquesta seqüència consta a les bases de dades com a RAB5IP (*RAB5 interacting-protein*), però, a diferència de GATE-16, no hi ha cap treball que descrigui aquesta proteïna i que justifiqui la nomenclatura de RAB5IP.

La resta de clones de cDNAs identificades es van considerar artefactes o falsos positius, els quals constitueixen la principal limitació de les tècniques de *two-hybrid*. Els falsos positius són seqüències concretes de DNA que, per les seves característiques o per la seva alta representació en les llibreries utilitzades, interaccionen i activen de manera inespecífica els promotors de LexA. Aquestes interaccions inespecífiques són difícilment identificades tècnicament ja que es comporten com a interaccions específiques. La valoració dels falsos positius es va basar en la revisió d'una extensa casuística recollida pel laboratori de Erica Golemis (<http://www.fccc.edu:80/research/labs/golemis/InteractionTrapInWork.html>) on es mostren els falsos positius més freqüentment trobats en l'*Interaction-trap*. També es van tenir el compte els nostres resultats en *screenings* fets amb altres molècules del cycle cel·lular utilitzant les mateixes llibreries. Algunes de les proteïnes trobades i que són considerades com a falsos positius habituals en aquesta tècnica són HSPs (*heat-shock-proteins*), proteïnes ribosòmiques o proteïnes mitocondrials.

2. P45^{SKP2} i CksHs1 interaccionen *in vivo*

Per a poder estudiar la interacció p45^{SKP2}-CksHs1, el cDNA *full-length* corresponent a CksHs1 es va clonar per PCR a partir de la llibreria de limfòcits humans i la seqüència es va comprovar mitjançant seqüenciació nucleotídica automàtica. A continuació, aquest cDNA es va subclonar en els plàsmids

pEG202, pMT2-MYC, pMT2-HA i pMT2-GST, construccions que també es van comprovar mitjançant seqüenciació nucleotídica automàtica. En altres experiments es va utilitzar una de les clones de CksHs1 aïllades a l'*Interaction-trap*, la qual es va anomenar CksHs1 Δ N perquè correspon al cDNA codificant d'un fragment carboxi-terminal de la proteïna CksHs1 (aminoàcids 19-79). Aquest cDNA també va ser subclonat en diversos plàsmids d'expressió.

Per confirmar *in vivo* la interacció trobada mitjançant *Interaction-trap*, es van realitzar experiments de coimmunoprecipitació. Les línies cel·lulars utilitzades van ser Jurkat E-6 i Cem, dues línies cel·lulars limfoides. Prèviament a la realització de l'experiment de coimmunoprecipitació es va objectivar la presència de proteïna p45^{SKP2} i CksHs1 en les esmentades línies cel·lulars mitjançant Immunoblots anti-p45^{SKP2} i anti-CksHs1, respectivament. L'experiment de coimmunoprecipitació es va realitzar lisant 150 milions de cèl·lules procedents de cada línia cel·lular estudiada. Es va afegir a una meitat de cada lisat 4 μ g d'anticòs anti-p45^{SKP2} i a l'altra meitat una quantitat equivalent de sèrum de conill pre-immune com a control negatiu. Els lisats resultants es van incubar en agitació a 4°C durant una hora amb proteïna A-sepharose[®], suport sòlid que permet precipitar la proteïna unida a l'anticòs, en aquest cas, la proteïna p45^{SKP2}. Els precipitats obtinguts es van rentar extensament i la detecció del CksHs1 que va coprecipitar amb el p45^{SKP2} immunoprecipitat es va fer mitjançant un Immunoblot anti-CksHs1. Els resultats es mostren a la figura 8.

Els resultats evidencien que CksHs1 interacciona amb p45^{SKP2}, ja que l'Immunoblot mostra una banda en el pes corresponent a CksHs1 que coimmunoprecipita amb p45^{SKP2} quan s'afegeix un anticòs anti-p45^{SKP2}. A més, aquesta interacció és específica ja que l'Immunoblot no mostra cap banda quan s'afegeix sèrum de conill pre-immune enlloc d'anticòs anti-p45^{SKP2}. Així, la interacció específica p45^{SKP2}-CksHs1 trobada mitjançant *Interaction-trap* es confirma *in vivo* en ambdues línies cel·lulars Jurkat i Cem.

A continuació es van dur a terme experiments de coprecipitació similars en la línia cel·lular Cos-7. La línia cel·lular Cos-7 és una línia de cèl·lules de ronyó

(GST-CksHs1ΔN) i en un tercer cas un plàsmid que permet l'expressió de GST utilitzada com a control negatiu. En els tres casos també es va cotransfectar un plàsmid que permet l'expressió de p45^{SKP2} fusionat a un *tag* de myc (myc-p45^{SKP2}). Les cèl·lules transfectades es van lisar a les 48h i els lisats es van incubar en agitació a 4°C durant 1h amb 25 µl de glutatió-sepharose®. La glutatió-sepharose® s'uneix específicament a derivats recombinants de GST (*glutathione-S-transferase*)

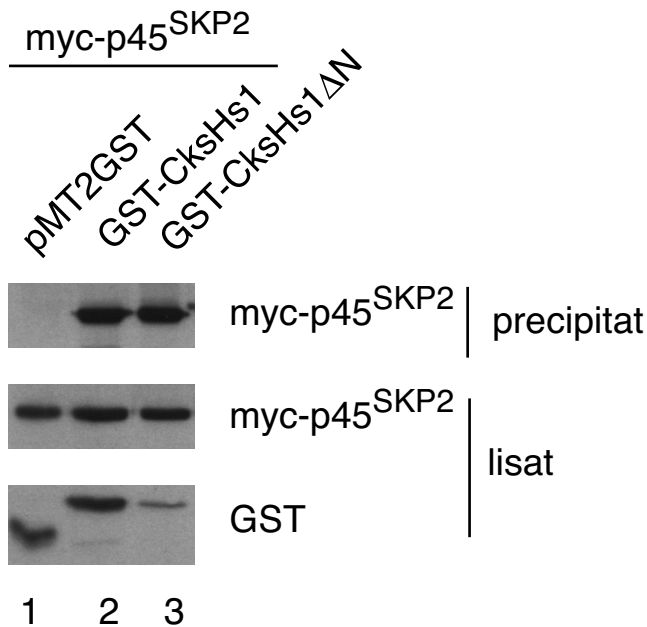


Figura 9. Coprecipitació de p45^{SKP2} i CksHs1 en cèl·lules Cos-7. Es mostra un Immunoblot fet amb un anticòs monoclonal anti-myc (plafons superior i mig) o anti-GST (plafó inferior). Cèl·lules Cos-7 (2x10⁵ cèl·lules per condició) es van transfectar de manera transitòria amb plàsmids d'expressió pMT2 que contenien GST (línia 1), GST-CksHs1 (línia 2) i GST-CksHs1ΔN (codifica la clona original obtinguda a l'*screening* que no conté els primers 18 aminoàcids) (línia 3) i myc-p45^{SKP2} (línies 1, 2 i 3). Es van obtenir lisats a les 48 h utilitzant un tampó de lisis amb NP-40 i les coprecipitacions es van fer emprant glutatió-sepharose® 50%. Les proteïnes coprecipitades (plafó superior) i els lisats totals (-5% dels lisats coprecipitats, plafons mig i inferior) es van analitzar mitjançant SDS-PAGE 12% i transferència a una membrana de PVDF.

i permet la purificació dels mateixos en forma de precipitats. Els precipitats així obtinguts contenien GST-CksHs1, GST-CksHs1ΔN i GST. Els precipitats van ser analitzats amb SDS-PAGE i amb un Western-blot utilitzant un anticòs anti-myc per a identificar el p45^{SKP2} coprecipitat amb CksHs1.

Els resultats mostrats a la figura 9 evidencien la interacció específica de p45^{SKP2} amb CksHs1 i amb CksHs1ΔN quan aquestes proteïnes son sobreexpressades en cèl·lules de mamífer Cos-7. Aquest resultat confirma els resultats anteriors i, alhora, valida el sistema de transfecció transitòria en cèl·lules Cos-7 com un bon model experimental per a l'estudi *in vivo* de la interacció entre dues proteïnes mitjançant la seva sobreexpressió.

3. El domini carboxi-terminal de p45^{SKP2} interacciona amb CksHs1

La tècnica *Interaction-trap* es va tornar a utilitzar aquesta vegada per a estudiar i quantificar la interacció directa entre proteïnes conegudes, una altra aplicació d'aquesta tècnica. En aquesta ocasió es van estudiar les proteïnes p45^{SKP2}, CksHs1, p19^{SKP1} i CDK2, ampliant així el nombre de proteïnes del cicle cel·lular estudiades. En el plantejament d'aquests experiments es van tenir en compte les dades de la literatura referents a la implicació de p45^{SKP2} i CksHs1 en la formació dels complexos Ciclina A/CDK2 de la fase S, així com l'associació descrita entre p45^{SKP2} i p19^{SKP1} formant part dels esmentats complexos.

En els experiments d'*Interaction-trap* quantitatiu es va mesurar l'activitat enzimàtica β-galactosidasa (mesurada en unitats βgal) sobre el substracte cromogènic ONPG (*o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside*), en un cultiu líquid de llevats on s'havia realitzat una *Interaction-trap* entre dues proteïnes conegudes. L'activitat enzimàtica β-galactosidasa només es produeix si hi ha interacció proteica a l'*Interaction-trap* i s'activa el gen reporter lacZ. Per a fer el següent experiment va ser necessari subclonar la seqüència completa del cDNA de CDK2 en el plàsmid pEG202 i transfectar el plàsmid resultant en llevats de la soca EGY048 per a crear una soca de llevats amb l'esquer LexA-CDK2. Les soques de

llevats utilitzades en l'experiment van ser EGY048 i EGY191, transfectades amb els plàsmids pEG202-CDK2 i pEG202-p45^{SKP2}, respectivament. Les proteïnes que es van voler testar com a possibles interactors de p45^{SKP2} i CDK2 van ser p19^{SKP1}, CDK2 o p45^{SKP2}, CksHs1 i CksHs1ΔN. Així doncs, les esmentades proteïnes es van subclonar en el plàsmid pJG4-5 i cada un dels plàsmids resultants amb els possibles interactors es va transfectar en les dues soques de llevats que contenien els esquers LexA-CDK2 i LexA-p45^{SKP2}. La valoració de la interacció es va fer mitjançant *Interaction-trap* mesurant el creixement i color dels llevats transfectats en plaques Gal ura-his-trp-leu- X-Gal seguint el mètode descrit a la literatura (Gyuris et al., 1993). La quantificació de la força d'interacció entre

Taula IX.

Esquer	Interactor	Unitats βgal
pGEG202-p45 ^{SKP2}	pJG4-5	37
	pJG4-5-p19 ^{SKP1}	161
	pJG4-5-CDK2	5
	pJG4-5-CksHs1	696
	pJG4-5-CksHs1ΔN	801
pGEG202-CDK2	pJG4-5	3
	pJG4-5-p19 ^{SKP1}	3
	pJG4-5-p45 ^{SKP2}	2
	pJG4-5-CksHs1	483
	pJG4-5-CksHs1ΔN	4

Interaction-trap quantitatiu per a valorar la interacció de p45^{SKP2} i CDK2 *full-length* amb p19^{SKP1}, CDK2 o p45^{SKP2}, CksHs1 i CksHs1ΔN. La *Interaction-trap* es va realitzar tal i com està descrit a la literatura. Les mesures dels nivells de β-galactosidasa (unitats βgal) en cultius líquids de llevats es van fer per duplicat de manera independent i la xifra mostrada és la mitja de les dues determinacions.

les dues proteïnes es va fer mitjançant l'assaig líquid per a mesurar l'activitat β -galactosidasa en els llevats. La taula IX il·lustra els resultats.

Els resultats relatius a p45^{SKP2} van mostrar la forta interacció d'aquest tant amb CksHs1 *full-length* (696 unitats gal) com amb CksHs1 Δ N (801 unitats gal), una de les clones aïllades inicialment en els *screenings*, en comparació amb el control negatiu pJG4-5 (37 unitats β gal). Val a dir que la xifra del control negatiu, malgrat ser clarament negativa, és lleugerament superior a altres controls negatius utilitzats, fet que reflexa una certa activació basal de la transcripció per part de p45^{SKP2} inclús emprant la soca EGY191. El control positiu va evidenciar i quantificar la interacció de p45^{SKP2} i p19^{SKP1} (161 unitats β gal). Aquest experiment no va mostrar interacció directa entre p45^{SKP2} i CDK2.

Els resultats relatius a CDK2 van evidenciar una forta interacció amb CksHs1 *full-length* (483 unitats gal). En canvi, no es va objectivar interacció en cas de CksHs1 Δ N (4 unitats gal), p19^{SKP1} (3 unitats gal) o p45^{SKP2} (2 unitats gal). Les resultats obtinguts referents a l'associació entre CDK2 i CksHs1 o p19^{SKP1} coincideixen amb les dades presents a la literatura, essent així reproductibles en el nostre model experimental. Per altra banda, malgrat s'hagi descrit que p45^{SKP2} forma part dels complexos Ciclina A/CDK2, els nostres resultats en *Interaction-trap* no evidencien associació directa entre CDK2 i p45^{SKP2}. Aquest últim resultat no exclou la possibilitat d'associació directa CDK2-p45^{SKP2} perquè els resultats negatius en les tècniques de *two-hybrid* no tenen el mateix valor que els resultats positius. Per exemple, és probable que la ciclina, la qual no ha estat transfectada en els llevats, sigui també necessària per a l'associació CDK2-p45^{SKP2} i així, tal i com es descriu a la literatura, p45^{SKP2} interaccioni alhora amb CDK2 i ciclina i així formi part dels complexos Ciclina A/CDK2.

Per a caracteritzar amb més profunditat la interacció p45^{SKP2}-CksHs1, aquest mateix assaig d'*interaction-trap* quantitatiu es va dur a terme aquesta vegada utilitzant per separat la part amino-terminal i la part carboxi-terminal de p45^{SKP2}. Al fer aquesta divisió es va tenir principalment en compte que la part amino-terminal de p45^{SKP2} conté el domini F-box, el qual és important en les funcions

actualment atribuïdes a p45^{SKP2}. Així doncs, el fragment comprès entre els aminoàcids 3 a 232 es va considerar la part amino-terminal o part F-box (p45^{SKP2}ΔC₃₋₂₃₂) i el fragment comprès entre els aminoàcids 153 a 436 es va considerar la part carboxi-terminal o domini ric en leucines (p45^{SKP2}ΔN₁₅₃₋₄₃₆). Ambdues parts es van subclonar mitjançant PCR en el plàsmid pEG202, la seqüència es va comprovar per seqüenciació nucleotídica automàtica i els plàsmids resultants es van transfectar a la soca de llevats EGY191 per a donar lloc a dues noves soques de llevats amb els esquers LexA-p45^{SKP2}ΔC₃₋₂₃₂ i LexA-p45^{SKP2}ΔN₁₅₃₋₄₃₆. Cadascuna de les noves soques es va transfectar amb pJG4-5, pJG4-5-p19^{SKP1} o pJG4-5-CksHs1. Com en l'experiment anterior, la valoració de la interacció es va fer mitjançant *Interaction-trap* i la quantificació de la força de la interacció es va fer mitjançant l'assaig líquid per a mesurar l'activitat β-galactosidasa. La figura 10 mostra els resultats obtinguts en l'experiment.

Els resultats mostren clarament que la part amino-terminal o F-box de p45^{SKP2} (indicada amb color més fosc) interacciona amb p19^{SKP1} (221 unitats βgal); en canvi, aquesta part no interacciona amb CksHs1 (6 unitats βgal). Per altra banda,




Esquers	Interactors	
	pJG45-p19 ^{SKP1}	pJG45-CksHs1
p45 ^{SKP2} ₍₃₋₄₃₅₎ 	161	696
p45 ^{SKP2} ΔC ₍₃₋₂₃₂₎ 	221	6
p45 ^{SKP2} ΔN ₍₁₅₃₋₄₃₆₎ 	7	422

Figura 10. *Interaction-trap* quantitatiu per a valorar la interacció de p45^{SKP2}₃₋₄₃₅, p45^{SKP2}ΔC₃₋₂₃₂, p45^{SKP2}ΔN₁₅₃₋₄₃₆ amb p19^{SKP1} i CksHs1. L'*Interaction-trap* es va realitzar tal i com està descrit a la literatura. Les mesures dels nivells de β-galactosidasa (unitats βgal) en cultius líquids de llevats es van fer per duplicat de manera independent i la xifra mostrada és la mitja de les dues determinacions. Els nombres entre parèntesi corresponen als aminoàcids de p45^{SKP2} fusionats al domini d'unió al DNA de LexA. La seqüència corresponent al F-box de p45^{SKP2} està indicada amb un color més fosc.

la part carboxi-terminal de p45^{SKP2} interacciona amb CksHs1 (422 unitats β gal) però no amb p19^{SKP1} (7 unitats β gal). Els resultats referents a la zona de p45^{SKP2} implicada en la interacció amb p19^{SKP1} estan en concordança amb dades prèvies presents a la literatura (Schulman et al., 2000). Els resultats referents a CksHs1 permeten descriure que la zona de p45^{SKP2} implicada en la interacció amb CksHs1 està compresa entre els aminoàcids 153 i 436 de p45^{SKP2}.

4. Diferents parts de CksHs1 interaccionen amb p45^{SKP2} i CDK2

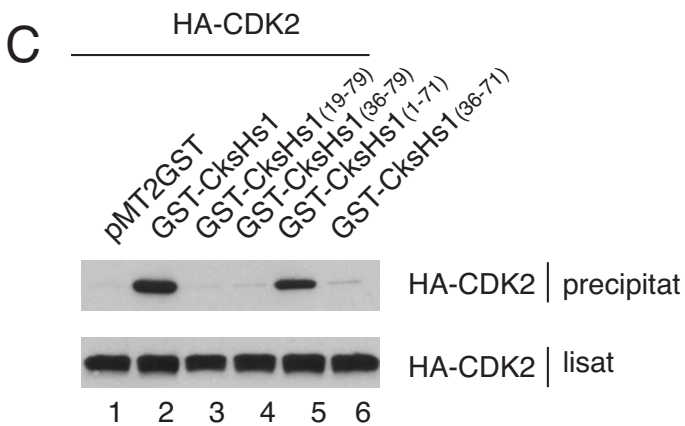
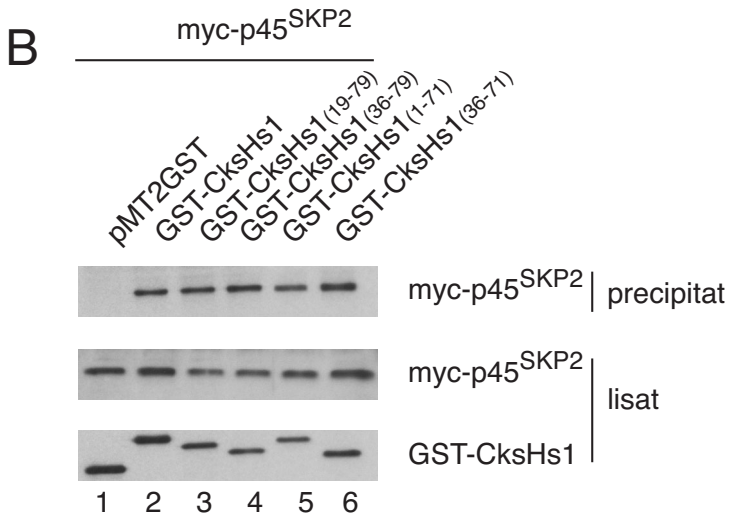
La proteïna CksHs1 es caracteritza per formar part dels complexos ciclina/CDK2 mitjançant la seva unió directa a CDK2, la CDK reguladora més important de la fase S. L'estructura cristal·lina del complexe CDK2/CksHs1 està ben determinada (Bourne et al., 1996) i, amb ella, les zones de CksHs1 importants per a la interacció amb CDK2 (zones compreses entre els aminoàcids 7-23 i 57-69) (Bourne et al., 2000). A més, s'ha descrit que p45^{SKP2} també forma part dels complexos Ciclina A/CDK2 (Zhang et al., 1995), per bé que la interacció directa de p45^{SKP2} amb la quinassa no ha estat estudiada en detall. Per tant, la identificació de la nova interacció p45^{SKP2}-CksHs1, dues proteïnes que formen part dels complexos ciclina/CDK2 però que mai fins ara s'havien relacionat entre si, comporta la revisió dels complexos ciclina/CDK2 a nivell estructural. Tenint en compte aquest objectiu, una primera aproximació va ser centrar-se en la proteïna CksHs1 i estudiar si la part de CksHs1 responsable de la interacció amb p45^{SKP2} i CDK2 és o no la mateixa.

Amb aquesta finalitat es van construir quatre mutants de CksHs1 fent diverses delecions i es van enfrontar a CDK2 i p45^{SKP2} en assajos de coprecipitació per a valorar la seva interacció. El mutant CksHs1(19-79) no inclou els primers 19 aminoàcids i deixa fora alguns dels llocs de CksHs1 importants per a la unió a CDK2. CksHs1(36-79) és més curt i no inclou els primers 36 aminoàcids. El tercer mutant és CksHs1(1-71) i correspon a gairebé tota la proteïna menys els últims 8 aminoàcids, incloent tots els llocs d'unió a CDK2. Finalment, el mutant

CksHs1(36-71) inclou els aminoàcids compresos entre el 36 i el 71. Aquestes delecions van ser fetes tenint en compte els llocs d'unió de CksHs1 a CDK2 i les estructures secundària i terciària que s'han descrit a la literatura (Bourne et al., 2000). Els quatre mutants van ser generats per PCR i la seva seqüència va ser comprovada mitjançant seqüenciació nucleotídica automàtica. El cDNA corresponent al CksHs1 *full-length* junt amb els cDNAs corresponents als quatre mutants esmentats es van subclonar en el vector d'expressió pMT2GST per a poder transfectar-los i expressar-los en cèl·lules Cos-7 obtenint així proteïnes recombinants de GST. Així mateix es van subclonar els cDNAs codificants de p45^{SKP2} i CDK2 en els plàsmids d'expressió pMT2myc i pMT2HA, respectivament, per a poder obtenir les proteïnes de fusió myc-p45^{SKP2} i HA-CDK2 expressades en cèl·lules Cos-7.

A continuació i emprant els plàsmids construïts es van fer dos experiments de coprecipitació de forma paral·lela. En el primer experiment es van transfectar els

Figura 11. Mapatge de les seqüències necessàries per a la interacció p45^{SKP2}-CksHs1. (A) Es mostra un esquema dels mutants delecionats de CksHs1 utilitzats en la realització dels experiments següents. En un color més fosc s'indiquen les regions descrites de CksHs1 necessàries per a la interacció amb CDK2. (B) Es mostra un Immunoblot realitzat amb un anticòs anti-myc (plafons superior i mig) o amb un anticòs anti-GST (plafó inferior). Cèl·lules Cos-7 (2×10^5 cèl·lules per condició) es van transfectar transitòriament amb plàsmids d'expressió pMT2 codificants de GST (línia 1), GST-CksHs1 (línia 2), GST-CksHs1(19-79) (línia 3), GST-CksHs1(36-79) (línia 4), GST-CksHs1(1-71) (línia 5), GST-CksHs1(36-71) (línia 6) i amb myc-p45^{SKP2} (línies 1 a 6). Es van obtenir lisats a les 48 h utilitzant un tampó amb NP-40 i les coprecipitacions es van fer emprant glutatió-sepharose® 50% (línies 1 a 6 del plafó superior). Les proteïnes coprecipitades (plafó superior) i els lisats totals (~5% dels lisats precipitats, plafons mig i inferior) es van analitzar mitjançant SDS-PAGE 12% i blot en una membrana de PVDF. (C) Es mostra un Immunoblot realitzat amb un anticòs anti-HA (plafons superior i inferior). Cèl·lules Cos-7 (2×10^5 cèl·lules per condició) es van transfectar transitòriament amb plàsmids d'expressió pMT2 codificants de GST (línia 1), GST-CksHs1 (línia 2), GST-CksHs1(19-79) (línia 3), GST-CksHs1(36-79) (línia 4), GST-CksHs1(1-71) (línia 5), GST-CksHs1(36-71) (línia 6) i amb HA-CDK2 (línies 1 a 6). Es van obtenir lisats a les 48 h utilitzant un tampó amb NP-40 i les coprecipitacions es van fer emprant glutatió-sepharose® 50% (línies 1 a 6 del plafó superior). Les proteïnes coprecipitades (plafó superior) i els lisats totals (~5% dels lisats precipitats, plafó inferior) es van analitzar mitjançant SDS-PAGE 12% i blot en una membrana de PVDF.



plàsmids pMT2GST amb CksHs1 o amb les quatre formes mutants de CksHs1 juntament amb el plàsmid pMT2myc-p45^{SKP2} en cèl·lules Cos-7. En el segon experiment es van transfectar els plàsmids pMT2GST amb CksHs1 o amb les quatre formes mutants de CksHs1 juntament amb el plàsmid pMT2HA-CDK2 en cèl·lules Cos-7. En els dos experiments es van lissar les cèl·lules a les 48 h i es van precipitar les proteïnes recombinants de GST amb glutatió-sepharose®. Els precipitats es van analitzar mitjançant SDS-PAGE i posterior Immunoblot anti-myc en el primer experiment i anti-HA en el segon experiment. La figura 11 mostra un esquema dels mutants de CksHs1 que es van utilitzar així com els resultats dels dos experiments.

Els resultats dels Immunoblots van mostrar amb quins mutants de CksHs1 coprecipitaven myc-p45^{SKP2} o HA-CDK2. Tots els mutants poden unir-se a p45^{SKP2}, essent la mínima regió testada la compresa entre els aminoàcids 36 a 71. En canvi, només el mutant amb els últims 8 aminoàcids de CksHs1, CksHs1(1-71), pot unir-se a CDK2. Per tant, aquests experiments permeten concloure que diferents regions de CksHs1 són necessàries per a unir-se a p45^{SKP2} i a CDK2 i que la zona de CksHs1 que interacciona amb p45^{SKP2} està compresa entre els aminoàcids 36 a 71 de CksHs1. A la vegada, els llocs de CksHs1 necessaris per a la unió a CDK2 descrits a la literatura es confirmen en el nostre model experimental.

5. CksHs1 modula la interacció entre CDK2 i p45^{SKP2}

La descripció de la nova interacció p45^{SKP2}-CksHs1 permet qüestionar-se el concepte clàssic vigent referent a l'estructura dels complexos Ciclina A/CDK2 on p45^{SKP2} i CksHs1 hi formen part de manera independent (Zhang et al., 1995). Per tant, aprofundint en l'estudi dels esmentats multicomplexes a nivell estructural, es va considerar la possibilitat que hi hagués certa dependència entre p45^{SKP2} i CksHs1 quan aquests formen part dels complexos Ciclina A/CDK2. Suposant que p45^{SKP2} i CksHs1 interaccionen de manera no independent amb

el complexe ciclina/CDK2, es va plantejar la hipòtesi que CksHs1 tingués algun efecte en la interacció entre p45^{SKP2} i CDK2.

Amb aquesta finalitat es van fer assajos de coprecipitació transfectant concentracions constants de CDK2 i p45^{SKP2}, les dues proteïnes de les quals es vol valorar la interacció, i concentracions creixents de CksHs1, proteïna de la qual es

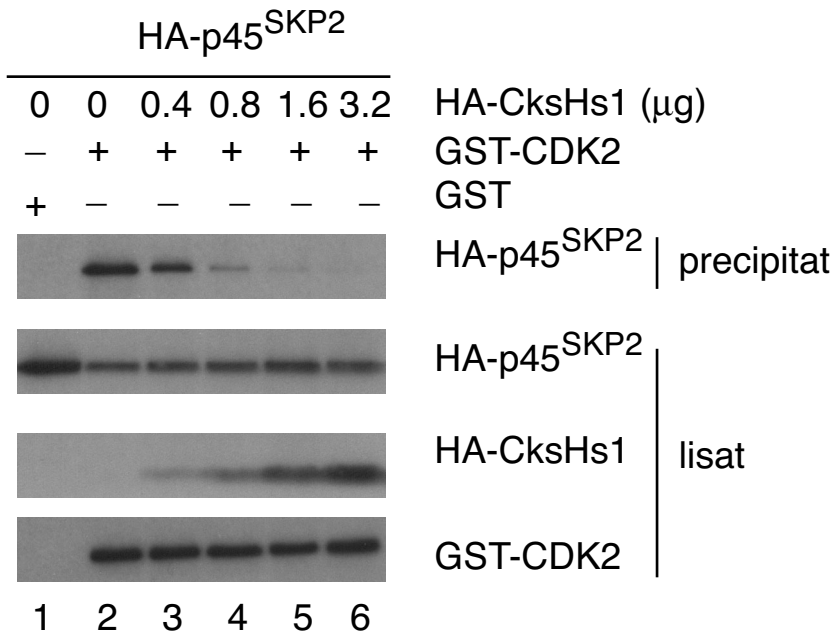


Figura 12. CksHs1 modula la interacció CDK2/p45^{SKP2}. Es mostra un Immunoblot realitzat amb un anticòs anti-HA (plafons superiors) o amb un anticòs anti-CDK2 (plafó inferior). Cèl·lules Cos-7 (2×10^5 cèl·lules per condició) es van transfectar transitòriament amb plàsmids d'expressió pMT2 codificant de GST (línia 1), GST-CDK2 (línies 2 a 6), HA-p45^{SKP2} (línies 1 a 6) i quantitats creixents de HA-CksHs1 (0,4, 0,8, 1,6 i 3,2 µg; línies 3 a 6). Es van obtenir lisats a les 48 h utilitzant un tampó amb NP-40 i les coprecipitacions es van fer emprant glutatió-sepharose® 50% (línies 1 a 6 del plafó superior). Les proteïnes coprecipitades (plafó superior) i els lisats totals (-5% dels lisats precipitats, plafons inferiors) es van analitzar mitjançant SDS-PAGE 13% i blot en una membrana de PVDF.

vol mesurar l'efecte en la interacció esmentada. Per a realitzar aquest experiment va ser necessari subclonar la seqüència completa del cDNA corresponent a CDK2 en el plàsmid d'expressió pMT2GST, la seqüència completa del cDNA corresponent a p45^{SKP2} en el vector d'expressió pMT2HA i la seqüència completa del cDNA codificant de CksHs1 en el vector d'expressió pMT2HA. Cèl·lules Cos-7 es van transfectar transitòriament amb concentracions constants de pMT2GST, pMT2GST-CDK2 i pMT2HA-p45^{SKP2} i amb concentracions creixents de pMT2HA-CksHs1. Així es van expressar en cèl·lules Cos-7 concentracions creixents de HA-CksHs1 (0,4, 0,8, 1,6 i 3,2 µg) juntament amb concentracions constants de GST i HA-p45^{SKP2} o GST-CDK2 i HA-p45^{SKP2}. Les cèl·lules es van lissar i els lisats van ser precipitats amb glutatió-sepharose[®]. Els precipitats van ser analitzats mitjançant un Immunoblot anti-HA, el qual va evidenciar el grau de coprecipitació de p45^{SKP2} amb CDK2 en presència de les quantitats creixents de CksHs1.

Els resultats d'aquest experiment, mostrats a la figura 12, van evidenciar que la presència de quantitats creixents de CksHs1 al lisat es corresponia amb quantitats decreixents de p45^{SKP2} coprecipitat amb CDK2. És a dir, les dades experimentals mostren que CksHs1 actua modulant d'alguna manera la interacció p45^{SKP2}-CDK2, ja que la presència de majors nivells de CksHs1 es corresponen amb la formació de menys complexos CDK2/p45^{SKP2}.

La obtenció d'aquestes evidències experimentals va plantejar, en primer lloc, la possibilitat que p45^{SKP2} i CksHs1 interaccionessin amb el mateix lloc de CDK2 i, així, que CksHs1 actués bloquejant la unió de CDK2 a p45^{SKP2}. En aquest cas, l'augment de CksHs1 arribaria a saturar tots els llocs d'unió de CDK2 i bloquejaria la unió de p45^{SKP2} a CDK2. Per a avaluar aquesta possibilitat es va fer un experiment similar a l'anterior però substituint CksHs1 *full-length* per CksHs1(19-79). La raó de la utilització del mutant delecionat de CksHs1 és que, com ha estat demostrat anteriorment (veure figura 11), aquest interacciona amb p45^{SKP2} però no amb CDK2. Suposant que sigui la unió de CksHs1 a CDK2 qui bloquegi la unió de p45^{SKP2} a CDK2, la utilització d'un mutant de CksHs1

que no s'uneix a CDK2 evitaria el bloqueig.

Així, es van fer assajos de coprecipitació transfectant concentracions constants de CDK2 i p45^{SKP2} i concentracions creixents de CksHs1(19-79). Per a realitzar aquest experiment va ser necessari subclonar el cDNA corresponent a CksHs1(19-79), forma delecionada de CksHs1 que no conté els 18 primers aminoàcids, en el plàsmid d'expressió pMT2HA. Es van expressar en cèl·lules Cos-7 concentracions creixents de HA-CksHs1(19-79) (0,4, 0,8, 1,6 i 3,2 µg) juntament amb concentracions constants de GST i HA-p45^{SKP2} o GST-CDK2 i HA-p45^{SKP2}. Les cèl·lules es van lissar i els lisats van ser precipitats amb glutatió-sepharose[®]. Els precipitats van ser analitzats mitjançant un Immunoblot anti-HA,

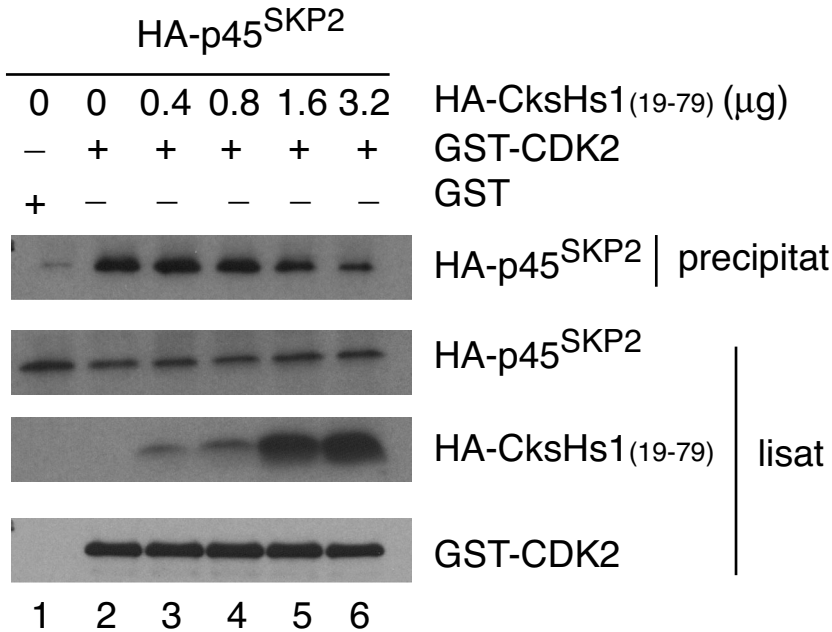


Figura 13. La unió de CksHs1 a CDK2 no és el que modula la interacció p45^{SKP2}-CDK2. Es mostra un experiment anàleg al realitzat a la figura 12 on el plàsmid d'expressió pMT2HA-CksHs1 va ser substituït pel plàsmid d'expressió pMT2HA-CksHs1(19-79), un mutant de CksHs1 generat per PCR que presenta la delecció dels 18 primers aminoàcids.

el qual va evidenciar el grau de coprecipitació de p45^{SKP2} amb CDK2 en presència de quantitats creixents de CksHs1(19-79).

Els resultats (figura 13) van mostrar, com en l'experiment anterior, una menor formació de complexos CDK2/p45^{SKP2} davant la presència de concentracions creixents de CksHs1(19-79), malgrat el fet que en aquest cas la forma de CksHs1 emprada no està associada a CDK2. Aquest resultat permet concloure que la unió de CksHs1 a CDK2 no és la causa de la menor presència de complexos CDK2/p45^{SKP2} quan augmenta la quantitat de CksHs1.

6. p45^{SKP2} i CksHs1 formen complexos amb CDK2 de manera mútuament exclouent

Els diferents resultats mostrats anteriorment mostren que p45^{SKP2} interacciona de manera directa amb CksHs1 i que diferents parts de CksHs1 estan implicades en les interaccions amb p45^{SKP2} i amb CDK2. Així mateix, hem vist que CksHs1 modula la formació de complexos CDK2/p45^{SKP2}, de manera que l'augment de CksHs1 condiciona una disminució del p45^{SKP2} unit a CDK2. A més, sembla ser que l'efecte modulador de CksHs1 sobre l'associació de p45^{SKP2} a CDK2 té lloc de manera independent a l'associació del propi CksHs1 a la quinassa. Totes aquestes dades són noves i com a tals difícils de situar en el marc teòric vigent referent a l'estructura dels complexos de ciclina/CDK2. Per tant, en l'esforç de donar explicació a les nostres dades experimentals, es van plantejar hipòtesis també noves referents a la composició estructural d'aquests complexos.

Fins al moment, cap dada prèvia referent a la interacció de p45^{SKP2} i CksHs1 amb CDK2, ni tampoc els nostres resultats referents a la interacció de p45^{SKP2} amb CksHs1 pot excloure la possibilitat que la unió de p45^{SKP2} a CDK2 no es faci de manera directa en una interacció proteïna-proteïna sinó a través de CksHs1. La hipòtesi que CksHs1 actuï com a nexa d'unió entre p45^{SKP2} i CDK2 no és l'únic plantejament coherent amb les nostres dades experimentals però, en tot cas, és una possibilitat que cal investigar per a poder excloure-la i considerar-ne

d'altres. A més, una de les dades obtingudes en els nostres experiments dona suport a aquesta hipòtesi, encara que no de manera conclouent. Aquesta dada fa referència a la manca d'interacció objectivada en els assajos d'*Interaction-trap* quantitativament realitzats en els dos sentits entre p45^{SKP2} i CDK2 (veure taula IX).

Per a avaluar la possible interacció entre p45^{SKP2} i CDK2 a través de CksHs1 es van realitzar dos experiments. En primer lloc, es va considerar que si bé la modulació exercida per CksHs1 en la formació dels complexos CDK2/p45^{SKP2} podria ser consistent amb aquesta hipòtesi, no ho seria el cas contrari, o sigui, la possible modulació exercida per p45^{SKP2} en la formació dels complexos CDK2/CksHs1. És a dir, en cas que CksHs1 sigui necessari per a l'associació de p45^{SKP2} amb CDK2, l'addició de p45^{SKP2} no hauria d'afectar l'associació CksHs1-CDK2. Per tant, en el primer experiment es va valorar l'efecte de p45^{SKP2} en la formació dels complexos CDK2/CksHs1. Amb aquesta finalitat es van fer assajos de coprecipitació mesurant l'associació de CksHs1 amb CDK2 en presència de concentracions creixents de p45^{SKP2}. Per a realitzar aquest experiment es va subclonar la seqüència completa del cDNA corresponent a CksHs1 en el plàsmid d'expressió pMT2myc i la seqüència completa del cDNA corresponent a p45^{SKP2} en el plàsmid d'expressió pMT2myc. Es van expressar en cèl·lules Cos-7 concentracions creixents de myc-p45^{SKP2} (0,4, 0,8, 1,6 i 3,2 µg) juntament amb concentracions constants de GST i myc-CksHs1 o GST-CDK2 i myc-CksHs1. Les cèl·lules es van lissar i els lisats van ser precipitats amb glutatió-sepharose®. Els precipitats van ser analitzats mitjançant un Immunoblot anti-myc el qual va evidenciar el grau de coprecipitació de CksHs1 amb CDK2 en presència de quantitats creixents de p45^{SKP2}.

El resultat d'aquest primer experiment va mostrar que l'augment de myc-p45^{SKP2} es corresponia a la presència de menys myc-CksHs1 unit a GST-CDK2 (veure figura 14). És a dir, s'evidencia que p45^{SKP2} modula la interacció CksHs1-CDK2, de igual manera que CksHs1 ho fa amb la interacció p45^{SKP2}-CDK2. El resultat d'aquest experiment permet establir dos fets. En primer lloc, aquest resultat és una dada que va en contra de la hipòtesi de la interacció indirecta entre

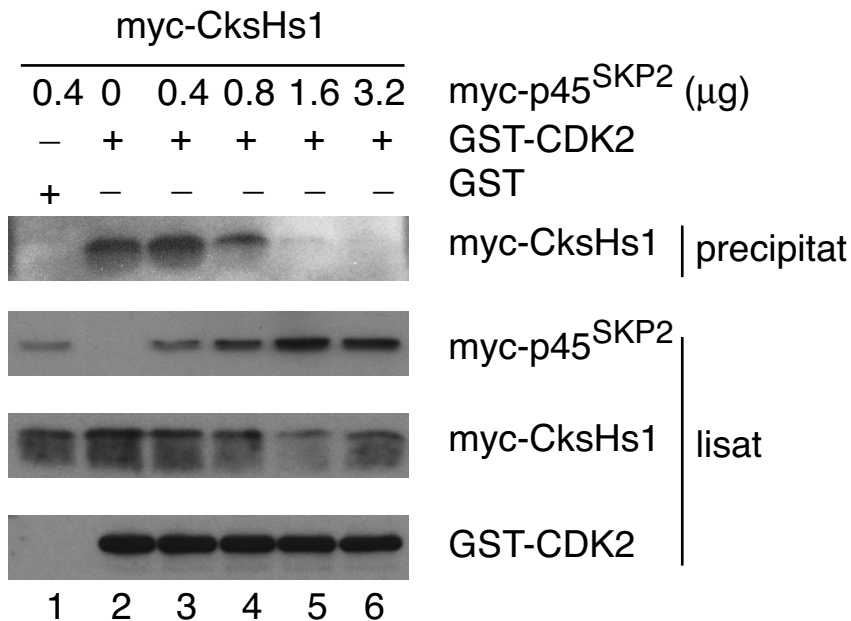


Figura 14. CksHs1 i p45^{SKP2} interaccionen amb CDK2 de manera mútuament exclouent. Es mostra un Immunoblot realitzat amb un anticòs anti-myc (plafons superiors) o amb un anticòs anti-CDK2 (plafó inferior). Cèl·lules Cos-7 (2×10^5 cèl·lules per condició) es van transfectar transitoriament amb plàsmids d'expressió pMT2 codificants de GST (línia 1), GST-CDK2 (línies 2 a 6), myc-CksHs1 (línies 1 a 6) i quantitats creixents de myc-p45^{SKP2} (0,4, 0,8, 1,6 i 3,2 µg; línies 1 i 3 a 6). Es van obtenir lisats a les 48 h utilitzant un tampó amb NP-40 i les coprecipitacions es van fer emprant glutatió-sepharose® 50% (línies 1 a 6 del plafó superior). Les proteïnes coprecipitades (plafó superior) i els lisats totals (~5% dels lisats precipitats, plafons inferiors) es van analitzar mitjançant SDS-PAGE 13% i blot en una membrana de PVDF.

p45^{SKP2} i CDK2 amb CksHs1 actuant de pont entre les dues molècules. En segon lloc, el resultat d'aquest experiment juntament amb els resultats dels experiments mostrats a l'apartat anterior (veure figures 12 i 13) permeten concloure que p45^{SKP2} i CksHs1 interaccionen amb CDK2 de manera mútuament exclouent. Per tant, segons els nostres experiments sembla ser que coexisteixen dos complexos de CDK2 i ciclina estructuralment diferents: ciclina/CDK2/CksHs1 i ciclina/

CDK2/p45^{SKP2}. A més, la formació d'aquests dos complexos es mútuament excloent i la disponibilitat de p45^{SKP2} i CksHs1 pot estar regulada per la formació d'un altre tipus de complexos, els complexos p45^{SKP2}/CksHs1. La troballa d'una interacció mútuament excloent entre aquestes molècules té, a més, importants implicacions funcionals ja que suggereix l'existència de dues activitats funcionals diferents atribuïbles als dos complexos diferents i permet inferir que l'associació p45^{SKP2}-CksHs1 pot actuar com un mutu mecanisme de regulació per a afavorir la formació d'un o altre complexos.

Donat el resultat del primer experiment i per a eliminar de manera concloent la possibilitat de la interacció de p45^{SKP2} i CDK2 a través de CksHs1 es va fer el segon experiment. La finalitat d'aquest experiment era, doncs, demostrar que CksHs1 no actua de pont en la interacció entre p45^{SKP2} i CDK2. L'experiment va consistir en saturar precipitats enriquits en CDK2 amb proteïna CksHs1 i a continuació valorar diferències en la unió de p45^{SKP2} als precipitats de CDK2 no saturats o saturats amb CksHs1. En cas d'unió p45^{SKP2}-CDK2 a través de CksHs1, el resultat de l'experiment mostraria una millor unió de p45^{SKP2} al CDK2 saturat amb CksHs1. En canvi, en cas que la unió p45^{SKP2}-CDK2 es fes de manera directa o no a través de CksHs1, el resultat de l'experiment no mostraria diferències o mostraria una millor unió de p45^{SKP2} al CDK2 no saturat amb CksHs1.

Per a la realització d'aquest segon experiment va ser necessària la subclonació del cDNA codificant de la seqüència completa de CksHs1 en el vector d'expressió pSRETB i la utilització del plàsmid resultant per a la producció de la proteïna de fusió His-CksHs1 en bacteris *E. coli*. Es van transfectar cèl·lules Cos-7 amb els vectors d'expressió pMT2GST i pMT2GST-CDK2. Els lisats enriquits amb proteïnes GST i GST-CDK2 es van precipitar amb glutatió-sepharose®. Els precipitats es van incubar amb i sense proteïna His-CksHs1, la qual es va afegir amb una quantitat saturant de CDK2. Les quantitats de proteïna CksHs1 saturants tant de CDK2 com de p45^{SKP2} van ésser determinades en un assaig previ, amb el qual també es va determinar que calia menys proteïna His-CksHs1

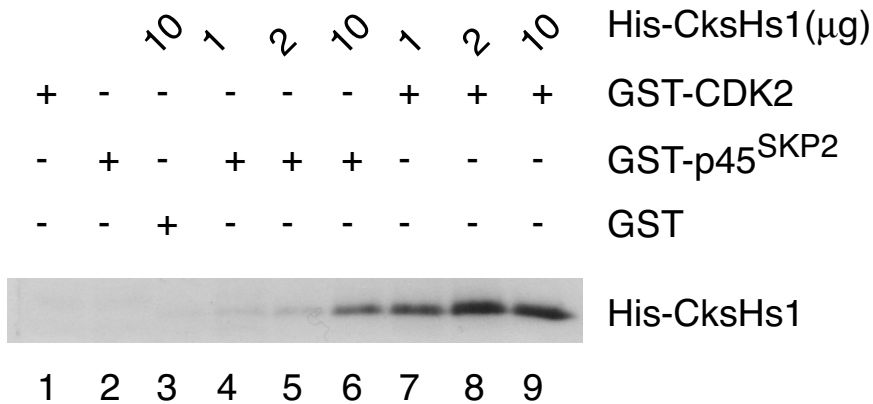


Figura 15. Determinació de la quantitat de His-CksHs1 que satura els precipitats de CDK2 i p45^{SKP2}. Es mostra un Immunoblot realitzat amb l'anticòs anti-CksHs1. Cèl·lules Cos-7 (2x10⁵ cèl·lules per condició) es van transfectar transitòriament amb plàsmids d'expressió pMT2 codificants de GST (línia 3), GST-p45^{SKP2} (línies 2 i 4 a 6) i GST-CDK2 (línies 1 i 7 a 9). Es van obtenir lisats a les 48 h utilitzant un tampó amb NP-40 i les coprecipitacions es van fer emprant glutatió-sepharose® 50%. Els precipitats es van incubar amb diferents quantitats de proteïna His-CksHs1 produïda en bacterïes (1, 2 i 10 μg; línies 1 a 7) durant 3 h. Els precipitats resultants es van analitzar mitjançant SDS-PAGE 15% i transferència a una membrana de PVDF.

per a saturar la quinassa que per a saturar p45^{SKP2} (veure figura 15). Els precipitats resultants es van incubar amb lisats produïts en cèl·lules Cos-7 transfectades amb el plàsmid pMT2HA-p45^{SKP2}. Finalment, els precipitats es van analitzar mitjançant SDS-PAGE i Immunoblot amb un anticòs anti-HA per a evidenciar diferències en la quantitat de proteïna p45^{SKP2} unida a CDK2 amb i sense l'addició de proteïna His-CksHs1 (veure figura 16).

Els resultats van evidenciar una major quantitat de proteïna p45^{SKP2} coprecipitada amb els precipitats de CDK2 no saturats amb His-CksHs1 en comparació amb la quantitat de proteïna p45^{SKP2} coprecipitada amb els precipitats de CDK2 saturats amb His-CksHs1. Aquest resultat permet descartar la hipòtesi que p45^{SKP2} i CDK2 s'uneixen a través de CksHs1 i dona suport a la concepció clàssica segons la qual aquesta interacció és directa. A més, el fet que la quantitat

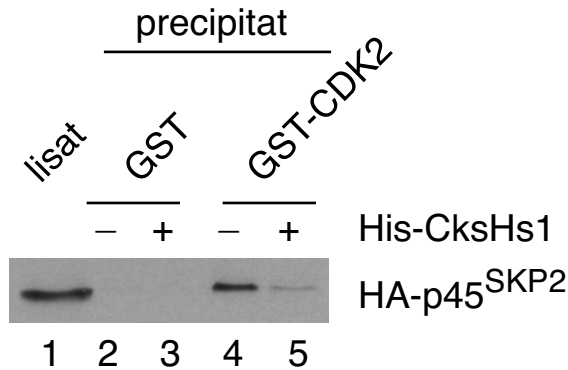


Figura 16. p45^{SKP2} no interacciona amb CDK2 a través de CksHs1. Es mostra un Immunoblot realitzat amb un anticòs anti-HA. Cèl·lules Cos-7 (10⁶ cèl·lules per condició) es van transfectar transitòriament amb plàsmids d'expressió pMT2 codificants de GST (línies 2 i 3) o GST-CDK2 (línies 4 i 5). Els lisats es van preparar 48 h després de la transfecció i es van precipitar utilitzant glutatió-sepharose[®] 50%. Els precipitats es van incubar amb quantitats saturants de proteïna His-CksHs1 produïda en bacteries (2µg; línies 3 i 5) o amb el tampó en el qual estava diluïda la proteïna (línies 2 i 4) durant 3 hores. Els precipitats resultants es van rentar extensament i es van incubar O/N amb un lisat de cèl·lules Cos-7 transfectades amb pMT2HA-p45^{SKP2}. Les proteïnes precipitades (línies 2 a 5) i el lisat total (-5% del lisat precipitat de HA-p45^{SKP2}, línia 1) es van analitzar mitjançant SDS-PAGE 12% i transferència a una membrana de PVDF.

de p45^{SKP2} que s'uneix al CDK2 saturat amb CksHs1 sigui clarament inferior, permet indicar que la presència de proteïna CksHs1 no només no facilita, sinó que bloqueja la interacció entre CDK2 i p45^{SKP2}. Aquesta última conclusió presenta, a més, concordança amb els resultats anteriors referents a la modulació exercida per CksHs1 sobre la unió p45^{SKP2}-CDK2.

7. La sobreexpressió de CksHs1 inhibeix l'activitat quinassa de CDK2

Les troballes referents a la interacció de p45^{SKP2} amb CksHs1, així com les implicacions evidenciades d'aquesta interacció en la formació dels complexos ciclina/CDK2 van plantejar l'estudi d'aquesta interacció a nivell funcional. Donat el fet que la principal activitat funcional dels complexos ciclina/CDK és la seva

activitat quinassa, la primera aproximació funcional va ser la valoració individual del possible efecte de CksHs1 i p45^{SKP2} en l'activitat quinassa CDK2. D'aquesta manera i tenint en compte que p45^{SKP2} i CksHs1 formen part dels complexos ciclina/CDK2 de manera mútuament exclouent, es va intentar valorar per separat l'activitat quinassa del CDK2 que forma part complexos ciclina/CDK2/CksHs1 i del CDK2 que pertany als complexos ciclina/CDK2/p45^{SKP2}.

Per a estudiar si CksHs1 o p45^{SKP2} tenen algun efecte en l'activitat quinassa de CDK2 *in vivo* es van fer assajos de coprecipitació en lisats de cèl·lules Cos-7 que contenien aquestes molècules sobreexpressades, seguits d'assajos per a mesurar l'activitat quinassa dels coprecipitats. Cèl·lules Cos-7 es van cotransfectar amb plàsmids que van permetre l'expressió transitòria de GST i GST-CDK2 juntament amb myc-p45^{SKP2} o myc-CksHs1 o HA-CksHs1(19-79). HA-CksHs1(19-79) és una forma mutada de CksHs1 que, a diferència de la forma nativa, no s'uneix a CDK2. Els lisats es van precipitar amb glutatió-sepharose® i l'activitat quinassa dels precipitats es va mesurar mitjançant un assaig de quinasses emprant la histona H1 com a substrat de fosforilació.

El resultat d'aquest experiment es mostra a la figura 17. El resultat va mostrar que la sobreexpressió de CksHs1 inhibia substancialment l'activitat quinassa de CDK2 *in vivo* en comparació amb el control negatiu. En canvi, l'activitat quinassa de CDK2 no es va veure modificada amb la sobreexpressió de CksHs1(19-79), dada consistent amb el fet que aquesta forma mutant de CksHs1 no s'uneix a CDK2, com ja s'havia demostrat en experiments anteriors. La sobreexpressió de p45^{SKP2} no va comportar canvis molt aparents en l'activitat quinassa de CDK2, si bé totes les vegades que es va reproduir l'experiment es va apreciar un lleu augment de l'activitat quinassa de CDK2 en comparació amb l'activitat basal. Aquest canvi en l'activitat quinassa va resultar massa lleu, però, per a concloure que es tractés d'una franca activació de la quinassa.

Per tant, el resultat d'aquest experiment permet concloure que la unió de CksHs1 a CDK2 es correspon amb una inhibició de l'activitat quinassa del CDK2 i que la unió de p45^{SKP2} a CDK2 es correspon amb la presència d'activitat

quinassa de CDK2. En l'establiment d'aquestes conclusions s'assumeix que el CDK2 que es precipita i del qual es mesura l'activitat quinassa està unit o bé al CksHs1 o bé al p45^{SKP2} transfectats. Aquesta assumptió és totalment factible perquè totes les molècules estudiades han estat sobreexpressades, fent que la quantitat de les proteïnes endògenes esdevingui comparativament menyspreable; a més, en experiments anteriors s'havia objectivat ja la interacció de les esmentades proteïnes sobreexpressades. Així doncs, aquesta dualitat funcional objectivada

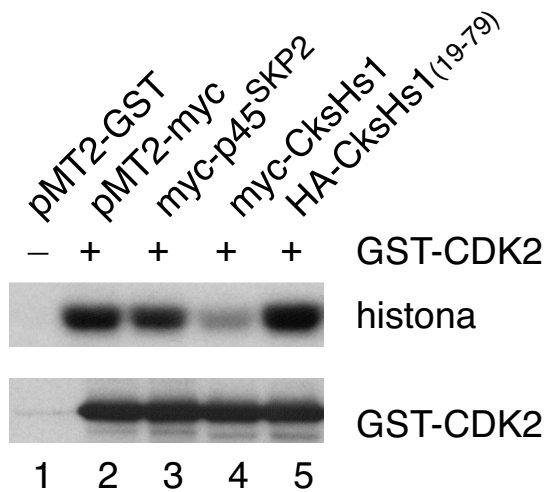


Figura 17. La sobreexpressió de CksHs1 inhibeix l'activitat quinassa de CDK2. Es mostra la anàlisi de l'activitat quinassa de CDK2 emprant com a substrat la histona H1. Cèl·lules Cos-7 (2×10^5 cèl·lules per condició) es van transfectar transitòriament amb plàsmids d'expressió pMT2 codificants de GST (línia 1) o GST-CDK2 (línies 2 a 5) i de myc (línia 2), myc-p45^{SKP2} (línia 3), myc-CksHs1 (línia 4) o HA-CksHs1(19-79) (línia 5). Els lisats es van preparar 48 h després de la transfecció i es van precipitar amb glutatió-sepharose[®] 50% durant 1 h. Els precipitats es van incubar a 30°C durant 10' en presència de histona H1 i [γ^{32} P]ATP. Els precipitats es van analitzar mitjançant SDS-PAGE 12% i autoradiografia (línies 1 a 5 del plaquí superior). Com a control del procés de transfecció ~5% dels lisats totals es van analitzar mitjançant SDS-PAGE 12%, transferència a una membrana de PVDF i Immunoblot amb un anticòs anti-CDK2 (línies 1 a 5 del plaquí inferior).

permet establir un paral·lelisme clar entre l'estructura dels dos tipus de complexos de CDK2, ciclina/CDK2/CksHs1 i ciclina/CDK2/p45^{SKP2}, de comportament mútuament exclouent i l'activitat quinassa de CDK2, inhibida en un cas i activa en l'altre.

8. La sobreexpressió de CksHs1 inhibeix l'activitat quinassa de CDK2 per un mecanisme indirecte

El fet que el CDK2 unit a CksHs1 presenti la seva activitat quinassa inhibida fa que CksHs1 es comporti aparentment com els CKIs, proteïnes inhibidores que s'uneixen i inhibeixen els complexos ciclina/CDK. Dos d'aquests inhibidors amb activitat demostrada sobre els complexos Ciclina A/CDK2 són p21^{Cip1/Waf1/Cap20/Sdi1} i p27^{Kip1}. El coneixement actual sobre els mecanismes inhibitoris dels CKIs p21^{Cip1} i p27^{Kip1} és parcial, però es pensa que els CKIs actuen mitjançant la seva unió als complexos ciclina/CDK2 i per un mecanisme inhibitori directe induint canvis conformacionals i interferint directament amb el lloc d'unió del substrat de CDK2. Per exemple, el mecanisme inhibitori de p27^{Kip1} es va clarificar amb l'estudi de l'estructura cristal·lina del complexe p27^{Kip1}/Ciclina A/CDK2 (Russo et al., 1996a). Aquests autors mostren que el domini amino-terminal inhibidor de p27^{Kip1} es situa entre CDK2 i Ciclina A, en el lloc d'unió del substrat a la quinassa; mentre que el domini carboxi-terminal entra en el lòbul amino-terminal de la quinassa; tot plegat causa canvis conformacionals i interfereix en l'estructura i funció del complexe Ciclina A/CDK2 a diversos nivells.

Així doncs, un cop objectivada la inhibició de l'activitat quinassa de CDK2 per part de CksHs1 i aprofundint en la caracterització de CksHs1 a nivell funcional, en el present estudi vem qüestionar-nos si el mecanisme d'acció de CksHs1 és directe com el dels CKIs o indirecte. En principi, el cas dels CKIs no sembla ser el mateix que el de CksHs1, ja que aquest s'uneix també a CDK2 però de manera molt diferent a com ho fa, per exemple, p27^{Kip1}. Estudis presents a la literatura mostren que CksHs1 s'uneix al lòbul carboxi-terminal de CDK2, lluny

del lòbul amino-terminal, del lloc d'unió de la ciclina, del lloc de les fosforilacions activadores i del lloc d'unió del substrat. A més, mostren que aquesta unió no causa canvis conformacionals en CDK2 (Bourne et al., 1996). Donades les característiques de la unió de CksHs1 a CDK2, sembla poc probable que CksHs1 pugui inhibir l'activitat quinassa de CDK2 per un mecanisme directe com ho fan determinats CKIs. De tota manera, es va buscar una confirmació experimental que pogués excloure aquesta possibilitat.

Així, per a esbrinar si CksHs1 exerceix la seva inhibició per un mecanisme directe, anàleg al mecanisme d'acció dels CKIs, es van estudiar comparativament els dos tipus d'inhibició. En l'adopció d'aquest plantejament es va assumir que la objectivació d'inhibició de l'activitat quinassa en precipitats de ciclina/CDK2 incubats amb una proteïna inhibidora en absència d'altres factors presents en els lisats cel·lulars, correspondria a un mecanisme d'inhibició directe. És a dir, aquest mecanisme inhibitori directe seria produït únicament per la interacció de les dues proteïnes sense l'acció d'altres proteïnes no presents en els complexos.

Seguint aquest plantejament es van analitzar comparativament assajos de quinasses en precipitats de CDK2 en presència de les proteïnes GST-p21^{Cip1} o His-CksHs1 produïdes en *E. coli* i emprant com a substrat de fosforilació la histona H1. En el primer experiment es van fer assajos de quinasses en immunoprecipitats de CDK2 fets a partir de lisats de cèl·lules Jurkat-E6 incubats amb un anticòs anti-CDK2 i proteïna A-sepharose[®]. Els precipitats van ser incubats amb diferents concentracions de proteïna GST-p21^{Cip1} (0,03, 0,125, 0,25, 0,5, 1 i 100 µg) o amb GST (1 µg) emprat com a control negatiu. L'activitat quinassa dels precipitats resultants va ser mesurada mitjançant un assaig de quinasses. Els resultats d'aquest experiment es mostren a la figura 18.

El segon experiment es va dur a terme precipitant GST-CDK2 procedent de lisats de cèl·lules Cos-7 transfectats amb el plàsmid d'expressió pMT2GST-CDK2. La obtenció de precipitats es va fer mitjançant la incubació amb glutatió-sepharose[®]. Els precipitats van ser incubats amb diferents concentracions de proteïna His-CksHs1 (0,1, 0,5, 1 i 5 µg). L'activitat quinassa dels precipitats

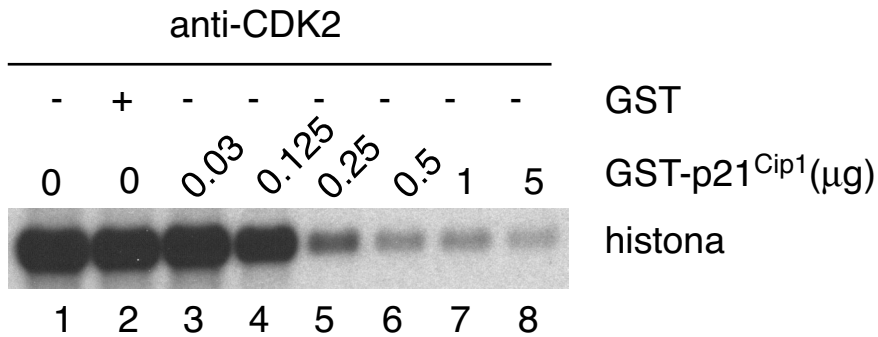


Figura 18. p21^{Cip1} inhibeix l'activitat quinasa de CDK2 per un mecanisme directe. Es mostra la anàlisi de l'activitat quinasa de CDK2 emprant com a substrat la histona H1. Es van lisar cèl·lules Jurkat-E6 (10x10⁶ cèl·lules per condició) amb un tampó que contenia NP-40. El CDK2 endogen es va immunoprecipitar amb un anticòs anti-CDK2 i proteïna A- sepharose[®] 50%. Els precipitats es van incubar a 30°C durant 10' en presència de histona H1, [³²P]ATP i GST (línia 2) o concentracions creixents de proteïna GST-p21^{Cip1} produïda en bactèries (0,03, 0,125, 0,25, 0,5, 1 i 5 µg; línies 3 a 8). Els precipitats es van analitzar mitjançant SDS-PAGE 12% i autoradiografia (línies 1 a 8).

resultants va ser mesurada mitjançant un assaig de quinasses. La figura 19 mostra el resultat d'aquest segon experiment.

El resultat del primer experiment evidencia que la unió de quantitats suficients de proteïna GST-p21^{Cip1} a precipitats de CDK2 és capaç d'inhibir l'activitat quinasa de CDK2. En canvi, el resultat del segon experiment evidencia que la unió de proteïna His-CksHs1 a precipitats de CDK2 no és capaç d'inhibir l'activitat quinasa de CDK2. La anàlisi conjunta del resultat dels dos experiments anteriors permet concloure que el mecanisme inhibitori de CksHs1 és diferent al mecanisme inhibitori de p21^{Cip1} el qual hem considerat com a mecanisme directe.

A més, comparant el resultat del segon experiment amb el resultat de l'experiment mostrat a la figura 17, s'evidencia que la proteïna CksHs1 té efectes inhibidors quan està sobreexpressada en un lisat i no té efectes inhibidors en



Figura 19. CksHs1 inhibeix l'activitat quinassa de CDK2 per un mecanisme indirecte. Es mostra la anàlisi de l'activitat quinassa de CDK2 emprant com a substrat la histona H1. Cos-7 (2×10^5 cèl·lules per condició) es van transfectar transitòriament amb plàsmids d'expressió pMT2 codificants de GST (línia 1) o GST-CDK2 (línies 2 a 6). Els lisats es van preparar 48 h després de la transfecció i es van precipitar amb glutatió-sepharose® 50%. Els precipitats es van incubar a 30°C durant 10' en presència de histona H1, $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ i concentracions creixents de proteïna His-CksHs1 produïda en bacterïes (0.1, 0.5, 1 i 5 µg; línies 3 a 6). Els precipitats es van analitzar mitjançant SDS-PAGE 12% i autoradiografia (línies 1 a 6).

absència de lisat. Aquests experiments indiquen també que la interacció de CksHs1 amb CDK2 és necessària però no suficient per a la funció inhibidora de CksHs1 sobre l'activitat quinassa de CDK2. Tot plegat permet concloure que el mecanisme inhibitori de CksHs1 pot considerar-se indirecte, no exercit únicament mitjançant la interacció directa CksHs1-CDK2 sinó també mitjançant l'acció d'un altre o altres factors de moment desconeguts però que estan presents al lisat cel·lular.

9. La sobreexpressió de p45^{SKP2} restableix l'activitat quinassa basal de CDK2 inhibida per CksHs1

En experiments anteriors de sobreexpressió de CksHs1 i CDK2 s'ha evidenciat que la unió de CksHs1 als complexos ciclina/CDK2 es correspon amb una

activitat quinassa de CDK2 inhibida. Així mateix, també en experiments de sobreexpressió de p45^{SKP2} i CDK2 s'ha objectivat que la unió de p45^{SKP2} als complexos ciclina/CDK2 es correspon amb una CDK2 activa. A més, altres experiments de sobreexpressió han mostrat que la interacció de p45^{SKP2} i CksHs1 amb CDK2 és mútuament exclouent. Totes aquestes dades suggereixen que la relació de dependència que s'estableix entre p45^{SKP2} i CksHs1 a nivell estructural

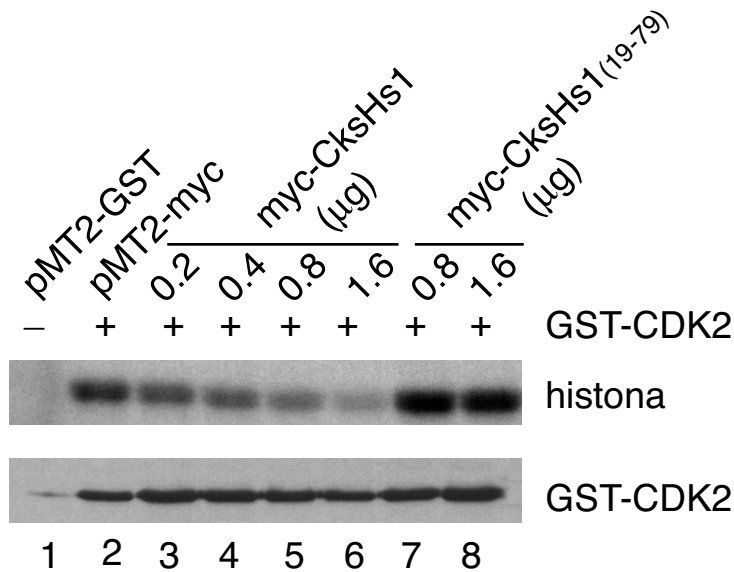


Figura 20. Determinació de la concentració inhibidora de CksHs1 sobre l'activitat quinassa de CDK2. Es mostra la anàlisi de l'activitat quinassa de CDK2 emprant com a substrat la histona H1. Cos-7 (2×10^5 cèl·lules per condició) es van transfectar transitòriament amb plàsmids d'expressió pMT2 codificants de GST (línia 1) o GST-CDK2 (línies 2 a 8) juntament amb diferents concentracions de plàsmids d'expressió pMT2 codificants de myc-CksHs1 (0,2, 0,4, 0,8 i 1,6 μg; línies 3 a 6) o myc-CksHs1(19-79) (0,8 i 1,6 μg; línies 7 i 8). Els lisats es van preparar 48 h després de la transfecció i es van precipitar amb glutatió-sepharose® 50%. Els precipitats es van incubar a 30°C durant 10' en presència de histona H1 i [γ^{32} P]ATP. Els precipitats es van analitzar mitjançant SDS-PAGE 12% i autoradiografia (línies 1 a 8 del plafó superior). Com a control de la transfecció, ~5% dels lisats es va analitzar mitjançant SDS-PAGE 12%, transferència a una membrana de PVDF i Immunoblot utilitzant un anticòs anti-CDK2 (línies 1 a 8 del plafó inferior).

en la formació de complexos amb ciclina/CDK2 pot reflectir-se en una relació de dependència a nivell funcional en la modulació de l'activitat quinassa de CDK2. Per tant, amb aquest plantejament es va voler estudiar el possible efecte de p45^{SKP2} en la funció inhibidòria de CksHs1 sobre l'activitat quinassa de CDK2.

Amb aquesta finalitat es van realitzar assajos de quinasses en precipitats de CDK2 en presència d'una concentració inhibidòria de CksHs1 i de concentracions creixents de p45^{SKP2}. En primer lloc va ser necessari determinar la mínima concentració inhibidora de CksHs1 detectable en l'assaig de quinasses utilitzat. Així, es va voler evitar que la presència de CksHs1 en excés evités la interacció de p45^{SKP2} i CDK2 i fes impossible objectivar un possible efecte de p45^{SKP2} o que fos necessari emprar grans quantitats de p45^{SKP2} per a objectivar aquest efecte. La determinació de la mínima concentració inhibidora de CksHs1 es va dur a terme realitzant assajos de quinasses en precipitats de CDK2 en presència de concentracions creixents de CksHs1. Cèl·lules Cos-7 es van cotransfectar amb plàsmids que van permetre l'expressió transitòria de GST i GST-CDK2 juntament amb concentracions creixents de myc-CksHs1 o myc-CksHs1(19-79). Els lisats es van precipitar amb glutatió-sepharose® i l'activitat quinassa dels precipitats es va mesurar mitjançant un assaig de quinasses emprant la histona H1 com a substrat de fosforilació.

El resultat de l'experiment (veure figura 20) va evidenciar, al igual que anteriors experiments, la inhibició de l'activitat quinassa de CDK2 per part de CksHs1. Així mateix el resultat va indicar que, si bé aquesta inhibició ja era palesa amb 0,2 µg de myc-CksHs1, la inhibició era clara amb 0,8 µg de myc-CksHs1, quantitat que es va considerar com a mínima quantitat inhibidora de l'activitat quinassa de CDK2 en aquest model experimental. Una altre resultat que va confirmar resultats d'experiments anteriors va ser que concentracions creixents de myc-CksHs1(19-79) no van modificar l'activitat quinassa de CDK2, indicant que la interacció CksHs1-CDK2 és necessària per a la funció de CksHs1 sobre CDK2.

El següent experiment va consistir en realitzar assajos de quinasses en precipitats de CDK2 en presència de 0,8 µg de myc-CksHs1, una quantitat inhibidora

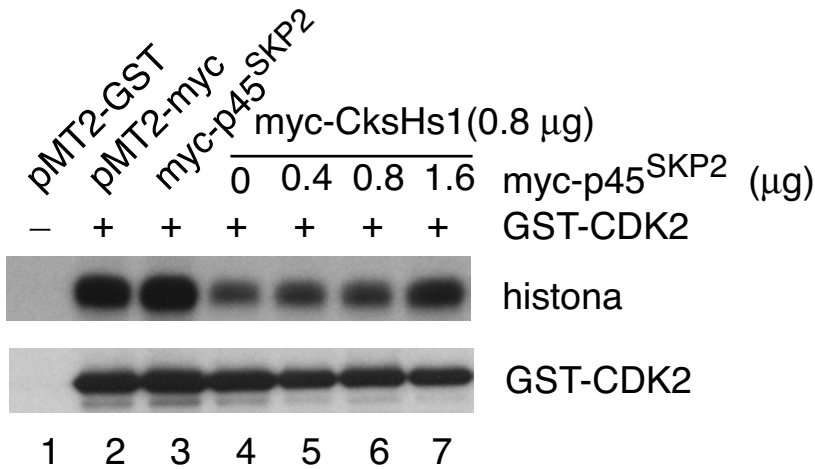


Figura 21. La sobreexpressió de p45^{SKP2} reestableix l'activitat quinasa basal de CDK2 inhibida per CksHs1. Es mostra la anàlisi de l'activitat quinasa de CDK2 emprant com a substrat la histona H1. Cos-7 (2×10^5 cèl·lules per condició) es van transfectar transitòriament amb plàsmids d'expressió pMT2 codificants de GST (línia 1) o GST-CDK2 (línies 2 a 7) juntament amb el plàsmid d'expressió pMT2 codificant de myc-CksHs1 (línies 4 a 7) i juntament amb diferents concentracions del plàsmid d'expressió pMT2 codificant de myc-p45^{SKP2} (0,4, 0,8 i 1,6 µg; línies 3 i 5 a 7). Els lisats es van preparar 48 h després de la transfecció i es van precipitar amb glutatió-sepharose[®] 50%. Els precipitats es van incubar a 30°C durant 10' en presència de histona H1 i [γ^{32} P]ATP. Els precipitats es van analitzar mitjançant SDS-PAGE 12% i autoradiografia (línies 1 a 7 del plaquí superior). Com a control de la transfecció, ~5% dels lisats es va analitzar mitjançant SDS-PAGE 12%, transferència a una membrana de PVDF i Immunoblot utilitzant un anticòs anti-CDK2 (línies 1 a 7 del plaquí inferior).

de l'activitat quinasa, i concentracions creixents de myc-p45^{SKP2}. Els assajos de quinasses es van realitzar d'igual manera que en l'experiment anterior. Aquest experiment es mostra a la figura 21.

El resultat d'aquest experiment va mostrar que la presència de myc-p45^{SKP2} pot activar l'activitat quinasa de CDK2 inhibida per CksHs1, fet clarament evidenciat en el progressiu augment de l'activitat quinasa inhibida paral·lelament a l'augment progressiu de les quantitats de proteïna p45^{SKP2}. L'experiment

mostra que l'addició de p45^{SKP2} als complexos inhibits de ciclina/CDK2/CksHs1 restableix l'activitat quinassa basal de CDK2. De manera semblant a altres experiments, l'addició única de p45^{SKP2} a complexos de CDK2 mostra un lleu augment de l'activitat quinassa. En la anàlisi del resultat d'aquests experiments de sobreexpressió es va assumir, una vegada més, que l'efecte objectivat era l'efecte de les proteïnes transfectades i que l'efecte de les proteïnes endògenes no era valorable per estar presents en una quantitat comparativament molt inferior a la quantitat present de les proteïnes transfectades.

10. El CDK2 unit a CksHs1 té la Tyr-15 fosforilada i el CDK2 unit a p45^{SKP2} no té la Tyr-15 fosforilada

Els resultats obtinguts mostren que CksHs1 i p45^{SKP2} tenen efectes contraris sobre l'activitat quinassa de CDK2 i la progressió de la fase S, fet consistent amb la seva interacció mútuament excloent amb CDK2 també evidenciada en aquest treball. Per tant, aquestes dades suggereixen l'existència d'un mecanisme mitjançant el qual CksHs1 afecta l'activitat quinassa de CDK2 i en el qual és necessària però no suficient la interacció de CksHs1 amb la quinassa; alhora, aquest és un mecanisme sobre el qual actua p45^{SKP2}. Fins ara no s'ha descrit cap mecanisme pel qual p45^{SKP2} pot afectar l'activitat de CDK2, a part dels efectes derivats de la ubiquïtinació d'altres reguladors del cicle. En canvi, en llevats s'ha vist que l'homòleg de CksHs1 pot actuar afavorint la fosforilació en tirosines de la quinassa mitòtica. A més, un dels mecanismes descrits pel qual poden inhibir-se les CDKs és la fosforilació de la Tyr-15, entre d'altres. Per tot això, es va decidir estudiar l'estat de fosforilació d'aquesta tirosina en els diferents cassos del nostre model experimental.

Amb aquesta finalitat es van realitzar assajos de coprecipitació seguits d'Immunoblots anti-fosfotirosines. En un primer experiment es van cotransfectar cèl·lules Cos-7 amb plàsmids que van permetre l'expressió de HA-CDK2, juntament amb cadascuna de les molècules estudiades: myc-CksHs1, myc-p45^{SKP2}

es va fer un Immunoblot anti-fosfotirossines en un intent de visualitzar canvis en l'estat de fosforilació de les tirosines de CDK2, en concret de la Tyr-15, en les diferents condicions. En aquest experiment van incloure's diversos controls per assegurar l'especificitat com, per exemple, la utilització d'una forma mutant de CDK2 on la Tyr-15 s'havia substituït per una Ala o el tractament amb CIAP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*).

El resultat d'aquest experiment no va mostrar diferències en l'estat de fosforilació de la Tyr-15 de CDK2 en les diverses condicions testades. Aquest resultat podia indicar que les molècules cotransfectades, CksHs1 i p45^{SKP2}, no tenen cap efecte en l'estat de fosforilació de la Tyr-15 de CDK2. Una altra possibilitat, però, és que aquest efecte hi sigui però no sigui detectable en aquest experiment. En aquest cas, l'experiment mostraria l'estat de fosforilació global de CDK2 però no l'estat de fosforilació del CDK2 unit a les diferents molècules cotransfectades, el qual pot ser només una petita part de tot el CDK2 present en els lisats cel·lulars.

Considerant aquesta segona possibilitat es va fer un segon experiment semblant a l'anterior, però aquesta vegada precipitant les molècules cotransfectades amb CDK2 i, a través d'elles, coprecipitant només el CDK2 unit a aquestes molècules. La finalitat d'aquest experiment era valorar canvis en l'estat de fosforilació de la Tyr-15 de CDK2 deguts a la unió de CksHs1 i p45^{SKP2} i, per tant, es va estudiar el CDK2 unit a aquestes molècules i no el CDK2 total.

Així, es van lisar i precipitar cèl·lules Cos-7 cotransfectades amb plàsmids d'expressió pMT2 codificants de GST, GST-CksHs1, GST-p45^{SKP2}, GST-CksHs1ΔN o GST-CksHs1 i GST-p45^{SKP2} junts, juntament amb HA-CDK2 i HA-CDK2Y15>A. A continuació es van precipitar els lisats amb glutatió-sepharose®, la qual cosa va permetre coprecipitar només el CDK2 unit a les molècules transfectades portadores de GST. En aquest cas també es van utilitzar controls d'especificitat. En un cas es va tractar el precipitat amb CIAP, la qual cosa ha de fer desaparèixer la banda fosforilada. En un altre cas es va transfectar CDK2 i CksHs1ΔN, un mutant de CksHs1 que no interacciona amb CDK2 i que no

p45^{SKP2} no la tenia. A més, els diversos controls van permetre comprovar que la banda estudiada corresponia a la Tyr-15 fosforilada. Així, la banda esmentada va desaparèixer amb el tractament amb CIAP i també quan es va utilitzar HA-CDK2Y15>A enlloc de HA-CDK2. Aquest resultat permet hipotetitzar que el CksHs1 unit a CDK2 actua afavorint la fosforilació o evitant la desfosforilació de la Tyr-15 de la quinassa i així inhibeix la seva activitat quinassa. A la vegada, la unió de p45^{SKP2} a CDK2 interfereix en el mecanisme d'acció de CksHs1, la Tyr-15 no està fosforilada i així es reverteix la inhibició de CksHs1 sobre CDK2.

11. p45^{SKP2} interacciona amb GATE-16^{GEF2}

Un altre resultat d'aquest estudi ha estat la identificació de la proteïna GEF2 o GATE-16 (*Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa*) com a interactor de p45^{SKP2}. Aquesta interacció va ser inicialment identificada en un *screening* de p45^{SKP2} fet amb la tècnica *d'Interaction-trap* en una llibreria de limfòcits humans (veure taula VII). GATE-16^{GEF2} és una proteïna identificada per la seva implicació en el transport intra-Golgi (Legesse-Miller et al., 1998), d'expressió constitutiva en la major part d'òrgans secretors i especialment el cervell (Sagiv et al., 2000) i localitzada a l'aparell de Golgi (Sagiv et al., 2000). L'estructura cristal·lina d'aquesta proteïna ha estat recentment descrita (Paz et al., 2000). Aquesta proteïna, però, no s'ha relacionat mai amb p45^{SKP2} o amb alguna altra molècula efectora o reguladora del cicle cel·lular.

Un cop identificada la proteïna GATE-16^{GEF2} com a possible interactor de p45^{SKP2} *in vitro*, es va procedir a la confirmació de la interacció *in vivo* mitjançant l'expressió transitòria d'ambdues proteïnes en cèl·lules de mamífer seguida d'assajos de coprecipitació. Per a realitzar aquest experiment va ser necessari, en primer lloc, obtenir el cDNA codificant de la seqüència completa de GATE-16^{GEF2}. Malgrat haver obtingut la seqüència completa de GATE-16^{GEF2} a l'*screening*, les característiques del plàsmid emprat (pJG4-5) no permeten subclonar directament aquest cDNA a altres plàsmids. Per tant, el cDNA

codificant de la seqüència completa es va generar mitjançant PCR emprant la llibreria de limfòcits humans utilitzada a l'*Interaction-trap* i la seqüència es va comprovar mitjançant seqüenciació nucleotídica automàtica. A continuació es va subclonar el cDNA resultant en el plàsmid d'expressió pMT2GST, obtenint així el plàsmid que permet l'expressió de la proteïna de fusió GATE-16^{GEF2} unida a GST. Aquest plàsmid es va cotransfectar en cèl·lules Cos-7 juntament amb el plàsmid pMT2HA-p45^{SKP2}. Com a control positiu es va utilitzar la interacció CksHs1-p45^{SKP2}.

Com es veu a la figura 24, el resultat d'aquest experiment va evidenciar la interacció específica de p45^{SKP2} amb GATE-16^{GEF2} *in vivo*. Un cop demostrada

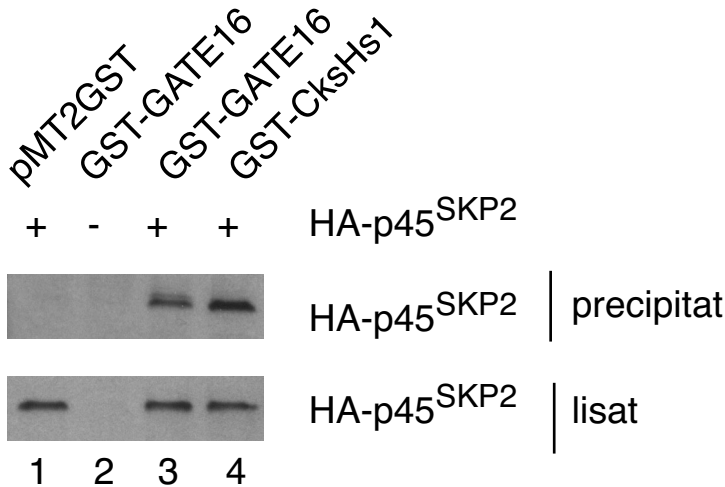


Figura 24. Coprecipitació de GATE-16^{GEF2} i p45^{SKP2} en cèl·lules Cos-7. Es mostra un Immunoblot fet amb un anticòs monoclonal anti-HA (plafons superior i inferior). Cèl·lules Cos-7 (2×10^5 cèl·lules per condició) es van cotransfectar de manera transitòria amb plàsmids d'expressió pMT2 que contenen GST (línia 1), GST-GATE-16^{GEF2} (línies 2 i 3) o GST-CksHs1 (línia 4) i HA (línia 2) o HA-p45^{SKP2} (línies 1, 3 i 4). Es van obtenir lisats a les 48 h utilitzant un tampó de lisi amb NP-40 i les coprecipitacions es van fer emprant glutatió-sepharose® 50%. Les proteïnes coprecipitades (plafó superior) i els lisats totals (~5% dels lisats coprecipitats, plafó inferior) es van analitzar mitjançant SDS-PAGE 12% i transferència a una membrana de PVDF.

la interacció específica entre aquestes dues molècules sorgeixen inevitablement nombroses qüestions inherents a la descripció d'una nova interacció proteica. Així, caldran en el futur més estudis per a caracteritzar aquesta associació a nivell molecular i estructural i per a esbrinar-ne la seva rellevància funcional. Aquests estudis, però, si bé son d'interès indubtable, no han estat realitzats en el present treball.

12. p45^{SKP2} interacciona amb la proteïna c-89

Tal i com va passar amb CksHs1 i GATE-16^{GEF2}, un *screening* fet amb la tècnica *Interaction-trap* va identificar una tercera proteïna com a possible interactor de p45^{SKP2}, la clona corresponent a aquesta proteïna va ser anomenada de manera provisional clona c-89. En aquest cas, però, la clona c-89 va ser aïllada d'una llibreria de cèl·lules HeLa (veure taula VIII). Aquesta clona es correspon amb una proteïna de 129 aminoàcids i amb dues zones clarament hidrofòbiques (aminoàcids 67 a 86 i 107 a 128) segons les prediccions fetes a partir de la seqüència (*Impred output for unknown*). La clona c-89 correspon, a més, a una proteïna descrita en les bases de dades com RAB5-IP (*RAB5-interacting protein*), però en aquestes no hi consten referències bibliogràfiques que descriguin aquesta proteïna o en justifiquin la nomenclatura. Per tant, en el present estudi ens hem seguit referint a aquesta proteïna com a proteïna c-89, esperant que propers estudis puguin permetre l'adjudicació d'un nom més adient. La figura 25 mostra la seqüència de la clona 89.

Com en el cas anterior, aquesta possible associació identificada *in vitro* es va intentar confirmar *in vivo* mitjançant l'expressió transitòria d'ambdues proteïnes en cèl·lules de mamífer, seguida d'assajos de coprecipitació. Així doncs, el cDNA corresponent a la seqüència completa de la clona c-89 va ser generat per PCR a partir de la llibreria de cèl·lules HeLa, comprovat per seqüenciació nucleotídica automàtica i subclonat en el plàsmid d'expressió pMT2GST. Com a control positiu es va utilitzar la interacció CksHs1-p45^{SKP2}.

Resultats

```
1 cctgctctgtagagccggcgcaaccggtagcttggccaggttgtgaggaaccgcagcggcccgaggaccgggcccgtg 80
81 agcctgcagccgccccgcgcccgtgacctgcgacccctagacccccgactacccttggctcagcccgcgccccaggccccg 160
161 gccccggcgcgcgcaecgggagg ATG AGC GGC GGG CGG CGG AAG GAG GAG CCG CCT CAG CCG CAG 224
1 M S G G R R K E E P P Q P Q 14
225 CTG GCC AAC GGG GCC CTC AAA GTC TCC GTC TGG AGT AAG GTG CTG CGG AGC GAC GCG GCC 284
15 L A N G A L K V S V W S K V L R S D A A 34
285 TGG GAG GAT AAG GAT GAA TTT TTA GAT GTG ATC TAC TGG TTC CGA CAG ATC ATT GCT GTG 344
35 W E D K D E F L D V I Y W F R Q I I A V 54
345 GTC CTG GGT GTC ATT TGG GGA GTT TTG CCA TTA CGA GGG TTC TTG GGA ATA GCA GGA TTC 404
55 V L G V I W G V L P L R G F L G I A G F 74
405 TGC CTG ATC AAT GCA GGA GTC CTG TAC CTC TAC TTC AGC AAT TAC CTA CAG ATT GAT GAG 464
75 C L I N A G V L Y L Y F S N Y L Q I D E 94
465 GAA GAA TAT GGT GGC ACG TGG GAG CTC ACG AAG GAA GGG TTT ATG ACC TCT TTT GCC TTG 524
95 E E Y G G T W E L T K E G F M T S F A L 114
525 TTC ATG GTC ATT TGG ATC ATC TTT TAC ACT GCC ATC CAT TAT GAC TGA tgggtgacagctccca 588
115 F M V I W I I F Y T A I H Y D * 130
589 agtgtccctatccagtcacaaggaccctcttgattacagcacaggaacttgatcgttggggaaaccccgcccttggaa 668
669 cttggaagaccctgttcttctggaccgcgaatcagtggttgggcatcagtgtttctgcaaggggtgtgacctgaaact 748
749 ttttaaaaaccaccaccttgggggaagcatttctgaatttatccatcaccacacatttcttcttggataccatcaagta 828
829 acagctattatttgccaagtggagctgtcatttaatttgatgcacctctggattcagatgaacattaaattgtcttct 908
909 cgattctccatcggggtgtagagtttttaaacatcaatggcatttcaagctcttctgaaacagcatggctgtatgtgcgtg 988
989 gtccatagcacagtcacatgcagcatctaataagagtttccattgtagaatgttttcacatactggaataaatcaaatctt 1068
1069 taattgagaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1104
```

Figura 25. Seqüència de la clona 89. Es mostra la seqüència nucleotídica corresponent a la clona aïllada com a interactor de p45^{SKP2} mitjançant la tècnica *Interaction-trap* emprant una llibreria de cèl·lules HeLa. En color més fosc es mostren els dos dominis transmembranosos designats segons les prediccions fetes a partir de la seqüència.

El resultat d'aquest experiment (veure figura 26) va evidenciar la interacció específica de p45^{SKP2} amb la clona c-89. Tal i com passa amb GATE-16, la descripció de la interacció entre p45^{SKP2} i la proteïna c-89 comporta el plantejament de noves qüestions i de nous estudis per a esbrinar la significància funcional d'aquesta associació, sobretot tenint en compte que en ambdós cassos es tracta de molècules no relacionades prèviament amb el funcionament del cycle cel·lular.

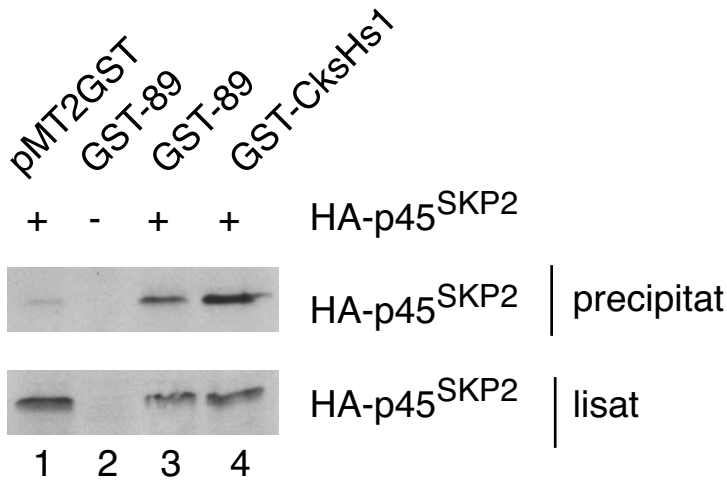


Figura 26. Coprecipitació de la proteïna corresponent a la clona 89 i p45^{SKP2} en cèl·lules Cos-7. Es mostra un Immunoblot fet amb un anticòs monoclonal anti-HA (plafons superior i inferior). Cèl·lules Cos-7 (2×10^5 cèl·lules per condició) es van cotransfectar de manera transitòria amb plàsmids d'expressió pMT2 que contenien GST (línia 1), GST-89 (línies 2 i 3) o GST-CksHs1 (línia 4) i HA (línia 2) o HA-p45^{SKP2} (línies 1, 3 i 4). Es van obtenir lisats a les 48 h utilitzant un tampó de lisis amb NP-40 i les coprecipitacions es van fer emprant glutatió-sepharose[®] 50%. Les proteïnes coprecipitades (plafó superior) i els lisats totals (~5% dels lisats coprecipitats, plafó inferior) es van analitzar mitjançant SDS-PAGE 12% i transferència a una membrana de PVDF.

13. A diferència de p45^{SKP2}, CksHs1, CDK2 i GATE-16^{GEF2} la proteïna c-89 té localització citoplasmàtica

Per a aprofundir en la descripció de les molècules del cicle cel·lular estudiades en aquest treball es va considerar interessant la determinació de la localització cel·lular de les mateixes, ja que aquesta no era coneguda en tots els casos. El mètode òptim per a fer això és la visualització de les proteïnes d'interès en cèl·lules vives mitjançant l'ús del microscopi de fluorescència. Aquest mètode té limitacions perquè no permet una visió dinàmica sinó només la visió d'un instant

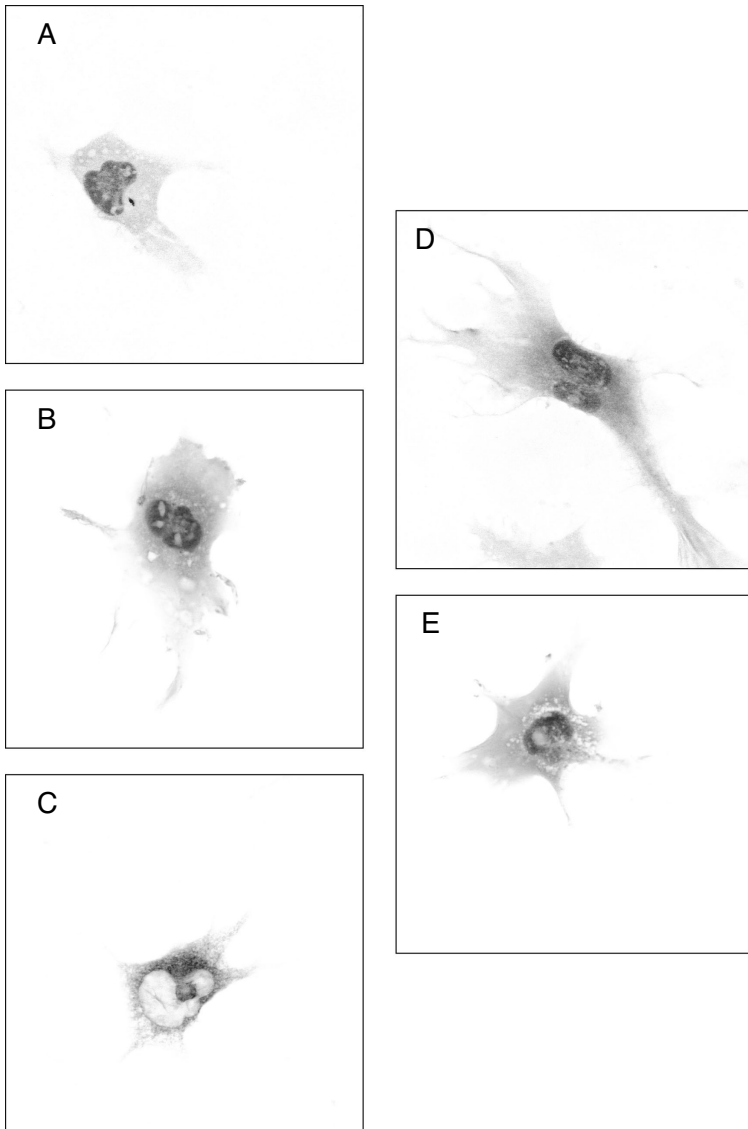


Figura 27. p45^{SKP2}, CksHs1, CDK2 i GATE-16 tenen una localització cel·lular nuclear i la proteïna corresponent a la clona 89 té una localització cel·lular citoplasmàtica. Es mostra en negre la localització cel·lular de GFP-p45^{SKP2} (A), GFP-CksHs1 (B), proteïna GFP-89 (C), GFP-CDK2 (D) i GFP-GATE-16 (E) determinada mitjançant estudis de fluorescència directa.

concret en el temps i, si no s'utilitzen cèl·lules sincronitzades, no es poden obtenir conclusions referents a cap fase concreta del cicle cel·lular. Tot i així, les dades obtingudes poden ser molt informatives en l'estudi d'una proteïna tant a nivell descriptiu com funcional.

Així, es van dur a terme assajos de fluorescència directa en cèl·lules de mamífer Cos-7 transfectades amb plàsmids pSR α GFP, els quals permeten l'expressió de les proteïnes d'interès fusionades amb el motiu fluorescent GFP (*green fluorescent protein*). Prèviament a la realització d'aquest experiment es van subclonar els cDNAs codificants de les seqüències completes de p45^{SKP2}, CDK2, CksHs1, GATE-16 i c-89 en el plàsmid pSR α HAGFP. Les cèl·lules transfectades es van fer créixer en crobresobjectes i, després de fixar-les, es van visualitzar en un microscopi de fluorescència on les proteïnes de fusió amb GFP es van identificar pel seu color verd.

Els resultats es mostren a la figura 27. Aquests denoten clarament que p45^{SKP2}, CDK2, CksHs1 i GATE-16 tenen una localització cel·lular predominantment nuclear, mentre que la proteïna c-89 té una localització cel·lular predominantment citoplasmàtica. La localització nuclear de p45^{SKP2}, CDK2 i CksHs1 és coherent tractant-se de molècules implicades en la fase S del cicle cel·lular. El resultat referent a GATE-16, en canvi, és sorprenent perquè aquest ha estat descrit com a factor soluble implicat en el transport proteic per l'aparell de Golgi. La proteïna c-89 mostra una localització clarament citoplasmàtica.

14. p45^{SKP2} i la proteïna c-89 colocalitzen formant agregats citoplasmàtics

En l'exposició d'aquest treball ja s'ha comentat que la regulació del cicle cel·lular comprèn un conjunt de processos complexos i que actuen a diversos nivells. Les dades inferides dels resultats previs fan referència a un mecanisme de regulació dels complexos de fase S Ciclina A/CDK2 exercit per p45^{SKP2} i CksHs1. Fins ara, doncs, s'ha estudiat en detall un mecanisme de regulació concret que es podria considerar qualitatiu, és a dir, diferents funcions de diferents

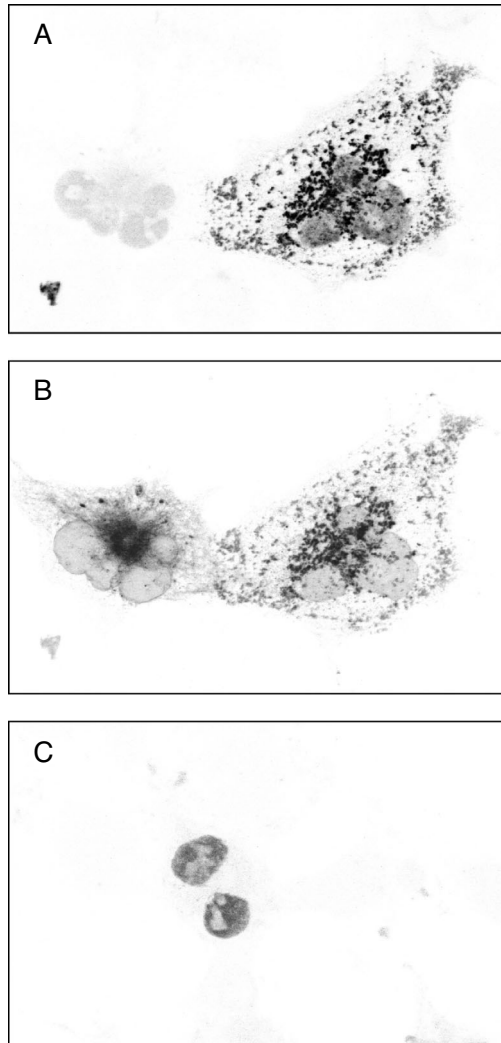


Figura 28. p45^{SKP2} i la proteïna 89 colocalitzen formant agregats citoplasmàtics. (A) Es mostra en negre l'expressió de la proteïna myc-p45^{SKP2} transfectada juntament amb la proteïna GFP-89, la qual no es veu a la imatge. (B) La cèl·lula més gran mostra en negre l'expressió de la proteïna GFP-89 transfectada juntament amb la proteïna myc-p45^{SKP2}, la qual no es veu a la imatge. La cèl·lula més petita mostra en negre l'expressió de la proteïna GFP-89 transfectada sola. (C) Es mostra en negre l'expressió de la proteïna myc-p45^{SKP2} cotransfectada amb la proteïna CDK2, la qual no es veu a la imatge.

molècules sobre uns determinats complexos ciclina/CDK. Ara bé, el cicle cel·lular està regulat a diversos nivells en el temps i en l'espai, a nivell qualitatiu i quantitatiu. Un d'aquests nivells de regulació és el control de la localització espacial dels components de la maquinària del cicle cel·lular, una regulació que pot considerar-se quantitativa ja que afecta a la disponibilitat de les molècules per a ser utilitzades en el lloc necessari, normalment el nucli cel·lular.

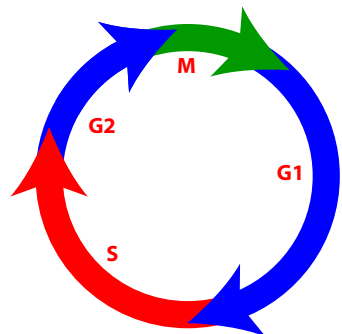
Per tant, tenint en compte les dades del resultat anterior on es descriu la localització predominant de les molècules implicades en aquest treball, es va plantejar la possibilitat que alguna d'elles pogués exercir fenòmens de regulació espacial sobre p45^{SKP2}, molècula objecte del nostre treball. Aquest plantejament es va fer exclouent altres possibilitats menys probables, ja que tant la proteïna GATE-16 com la proteïna c-89, malgrat interaccionar amb p45^{SKP2} *in vivo* i *in vitro*, no semblen tenir cap relació amb els complexos ciclina/CDK2.

Així doncs, es van dur a terme assajos de fluorescència directa i d'immunofluorescència indirecta per mesurar l'efecte de GATE-16 i proteïna c-89 en la localització cel·lular de p45^{SKP2}. Es van transfectar cèl·lules de mamífer Cos-7 amb plàsmids d'expressió pMT2 codificants de les proteïnes de fusió myc-p45^{SKP2} i myc-p45^{SKP2} juntament amb GFP-CDK2, GFP-CksHs1, GFP-GATE-16 o GFP-89. Les proteïnes de fusió amb GFP van poder-se visualitzar directament de color verd i la proteïna p45^{SKP2} va visualitzar-se de color vermell mitjançant la incubació amb un anticòs primari anti-myc i un anticòs secundari anti-*mouse* rodaminat.

Els resultats van evidenciar que només la transfecció conjunta de c-89 amb p45^{SKP2} causava canvis evidents en la localització i distribució cel·lulars d'ambdues proteïnes (veure figura 28). En canvi, la transfecció conjunta de CDK2 o CksHs1 o GATE-16 amb p45^{SKP2} no va permetre objectivar canvis en la localització cel·lular de p45^{SKP2}. Per tant, les dades experimentals mostren que la transfecció conjunta de p45^{SKP2} i c-89 causa la colocalització d'ambdues proteïnes i la distribució de les mateixes en agregats de distribució predominantment perinuclear. Aquest últim resultat és força suggerent i interessant, i, tal i com

passa amb altres resultats d'aquest treball, constitueix una base sòlida per a l'inici d'altres estudis que contribueixin a la completa caracterització del paper regulador de p45^{SKP2} en la progressió del cicle cel·lular.

V. DISCUSSIÓ



Els resultats obtinguts en aquest treball han permès la descripció de tres noves interaccions proteiques de p45^{SKP2}, una proteïna reguladora del cicle cel·lular. L'estudi en profunditat a nivell estructural i funcional d'una d'aquestes interaccions en el context dels complexos Ciclina A/CDK2 de la fase S ha permès suggerir un nou mecanisme de regulació de l'activitat dels esmentats complexos. Per tant, amb l'atribució d'una funció en els complexos Ciclina A/CDK2, el paper de p45^{SKP2} en la regulació del cicle cel·lular, limitat fins ara a la seva funció en la ubiquïtinització, s'amplia. Aquesta nova visió, clarament evidenciada en el nostre treball, està en concordança amb estudis recents mitjançant els quals p45^{SKP2} està adquirint una importància creixent en el control de la fase S del cicle cel·lular. A més, les altres interaccions proteiques descrites en aquest treball, encara que no estudiades en profunditat, plantegen noves i interessants qüestions pel que fa a la implicació funcional de les mateixes en processos relacionats o no amb el cicle cel·lular.

Aquest estudi s'inicia amb la descripció de la interacció entre p45^{SKP2} i CksHs1. Ambdós p45^{SKP2} i CksHs1 son dues proteïnes reguladores del cicle cel·lular conegudes, entre altres coses, per formar part dels complexos actius de la fase S Ciclina A/CDK2 (Zhang et al., 1995). En el moment de començar el nostre estudi, la interacció directa entre aquestes dues molècules no havia estat descrita. En el nostre estudi, CksHs1 es va identificar com a possible interactor de p45^{SKP2} realitzant diversos *screenings* amb la tècnica *Interaction-trap* emprant p45^{SKP2} com a esquer i llibreries de limfòcits T humans i de cèl·lules HeLa. La interacció es va confirmar mitjançant estudis de coimmunoprecipitació en les línies cel·lulars limfoides Cem i Jurkat, així com en estudis de coprecipitació sobreexpressant p45^{SKP2} i CksHs1 en cèl·lules de mamífer Cos-7.

A continuació la interacció descrita entre p45^{SKP2} i CksHs1 va ser analitzada a nivell molecular. Tenint en compte que p45^{SKP2} presenta el motiu característic F-box a la seva meitat amino-terminal, es van fer mutants de p45^{SKP2} i la seva zona d'interacció amb CksHs1 va ser mapejada i quantificada mitjançant assajos d'*Interaction-trap* quantitativs. Aquests assajos van demostrar que la regió de

p45^{SKP2} necessària per a la interacció amb CksHs1 està inclosa en la meitat carboxi-terminal de p45^{SKP2} (aminoàcids 153 a 436), regió que conté diverses repeticions riques en leucina; mentre que la part amino-terminal i el domini F-box de p45^{SKP2}, regió important per a la interacció amb p19^{SKP1}, no s'han demostrat necessaris per a aquesta associació.

p45^{SKP2} es una proteïna reguladora del cicle cel·lular descrita per pertànyer als complexos lligassa de la ubiquitina SCF^{SKP2} i als complexos actius de la fase S Ciclina A/CDK2. Com a integrant dels complexos SCF^{SKP2}, p45^{SKP2} interacciona amb el complex SCF a través del seu domini F-box i és responsable de la ubiquitinització de diversos reguladors i efectors del cicle cel·lular. Pel que fa al seu paper com a integrant dels complexos Ciclina A/CDK2, ambdós dominis amino-terminal i carboxi-terminal de p45^{SKP2} s'han implicat en la interacció amb els complexos Ciclina A/CDK2 i tant s'han descrit efectes inhibidors com activadors sobre l'activitat quinassa de CDK2. Per altra banda, CksHs1 pertany a la família de proteïnes reguladores del cicle cel·lular Cks, el paper regulador de les quals s'ha relacionat amb els complexos ciclina/CDK de les fases S i M i amb el complex APC/ciclosoma. Per tant, ambdós p45^{SKP2} i CksHs1 tenen en comú la seva relació amb els complexos actius Ciclina A/CDK2 de fase S, la qual cosa fa pensar que la seva interacció pot estar relacionada amb l'estructura i l'activitat d'aquests complexos. Amb aquest plantejament i un cop descrita i confirmada la interacció p45^{SKP2}-CksHs1, el present treball va centrar-se en l'estudi de la interacció p45^{SKP2}-CksHs1 en el context de la formació i funció dels complexos Ciclina A/CDK2.

Així doncs, seguint amb l'objectiu establert es va aprofundir en l'estudi dels complexos integrats per Ciclina A/CDK2, p45^{SKP2} i CksHs1 a nivell estructural. En aquest moment cal aclarir que en l'estudi d'aquests complexos es va assumir en tot moment que la ciclina associada a CDK2 era Ciclina A. Aquesta assumpció es va dur a terme tenint en compte les dades bibliogràfiques referents a p45^{SKP2} i CksHs1 i considerant com a prioritat principal del nostre treball l'estudi de l'efecte de la interacció descrita en els complexos de CDK2 amb la seva

corresponent ciclina i no l'estudi específic de la ciclina associada.

Un cop descrita la part de p45^{SKP2} que s'associa a CksHs1 i tenint en compte que la part de CksHs1 que interacciona amb CDK2 és coneguda, es va procedir a l'estudi de la part de CksHs1 responsable de la interacció amb p45^{SKP2}. Estudis de coprecipitació amb diferents mutants de CksHs1 van permetre mapejar la zona d'interacció CksHs1-p45^{SKP2} en la zona de CksHs1 compresa entre els aminoàcids 36 a 71 alhora que es van confirmar les zones de CksHs1 importants per a la interacció amb CDK2 descrites en altres estudis (aminoàcids 7 a 23 i 57 a 70). Aquests resultats van permetre concloure que diferents regions de CksHs1 interaccionen amb p45^{SKP2} i CDK2.

El concepte clàssic vigent descrit per Zhang et al. considera que els complexos actius de la fase S estan integrats per Ciclina A, CDK2, p45^{SKP2}, p19^{SKP1} i CksHs1, on p45^{SKP2} i CksHs1 s'uneixen a Ciclina A/CDK2 de manera independent i p19^{SKP1} s'uneix al complexe a través de p45^{SKP2}. Posteriorment, la cristal·lització dels complexos Ciclina A/CDK2, CDK2/CksHs1 i p45^{SKP2}/p19^{SKP1} ha permès confirmar l'associació directa tant de CksHs1 a CDK2 com de p45^{SKP2} a p19^{SKP1}. L'associació entre p45^{SKP2} i el complexe Ciclina A/CDK2, però, no ha estat encara revelada mitjançant estudis cristal·logràfics.

Per tant, el fet que la interacció de p45^{SKP2} amb Ciclina A/CDK2 encara no hagi estat descrita en detall, juntament amb la descripció de la nova interacció p45^{SKP2}-CksHs1, i el fet que diferents parts de CksHs1 siguin les responsables de la interacció amb CDK2 i p45^{SKP2} van plantejar diferents possibilitats pel que fa a l'estructura i formació dels complexos ciclina/CDK2 de la fase S. A aquestes consideracions s'ha d'afegir el fet que, en les nostres mans, no es va detectar la interacció directa p45^{SKP2}-CDK2 mitjançant es sistema *two-hybrid*. Pel que fa a aquest últim punt, val a dir que la manca d'interacció mitjançant la tècnica *two-hybrid*, si bé cal tenir-la en compte, no és una dada conclouent i té menys valor que la determinació d'interacció positiva. En aquest moment també cal dir que si bé en les consideracions i discussions posteriors no s'esmenta p19^{SKP1}, aquesta molècula també ha estat descrita com a integrant dels complexos Ciclina

A/CDK2 juntament amb p45^{SKP2} i CksHs1, però no s'esmenta per no ser objecte del nostre estudi.

Així doncs, tenint en compte les consideracions anteriors es va plantejar la possibilitat que l'associació de p45^{SKP2} i CksHs1 amb els complexos ciclina/CDK2 no fos independent. Els resultats d'experiments de coprecipitació en cèl·lules Cos-7 van mostrar que l'associació entre p45^{SKP2} i ciclina/CDK2 no és independent de la presència de CksHs1. És més, aquests experiments van evidenciar que l'augment de CksHs1 es correspon a una disminució del p45^{SKP2} unit a CDK2. Davant d'aquest resultat i donat el fet que la zona de CDK2 o ciclina/CDK2 responsable de la unió amb p45^{SKP2} no està ben determinada, es va plantejar la possibilitat que la mateixa zona de CDK2 fos la responsable de la unió amb p45^{SKP2} i CksHs1 i que, per tant, aquestes dues molècules interaccionessin competitivament amb la quinassa. Aquesta possibilitat va ser testada mitjançant la realització d'experiments de coprecipitació per mesurar la interacció entre p45^{SKP2} i CDK2 en presència de diferents quantitats de CksHs1(19-79), una forma mutant de CksHs1 caracteritzada per unir-se a p45^{SKP2} però no a CDK2. Davant els resultats d'aquests experiments es va desestimar la possibilitat d'interacció competitiva entre CksHs1 i p45^{SKP2} per unir-se al mateix lloc de CDK2, ja que la interacció p45^{SKP2}-CDK2 mostra igualment dependència de la presència de CksHs1(19-79).

Les nostres dades referents a l'associació no independent de CksHs1 i p45^{SKP2} amb CDK2 comporten un canvi substancial en el concepte clàssic de l'estructura dels multicomplexes Ciclina A/CDK2/p45^{SKP2}/CksHs1. Alhora, aquestes dades plantegen noves incògnites pel que fa al mecanisme pel qual CksHs1 modula la interacció p45^{SKP2}-CDK2. Un cop exclosa la possibilitat d'interacció competitiva per a compartir el mateix lloc d'unió de CDK2, es van valorar dues opcions coherents amb les nostres troballes que podrien explicar l'efecte modulador de CksHs1 (veure figura 29). La primera opció planteja que la formació del complex p45^{SKP2}/CksHs1 inhibeix la formació del complex p45^{SKP2}/CDK2. En aquest cas l'augment de CksHs1 segrestaria p45^{SKP2} evitant l'associació d'aquest a

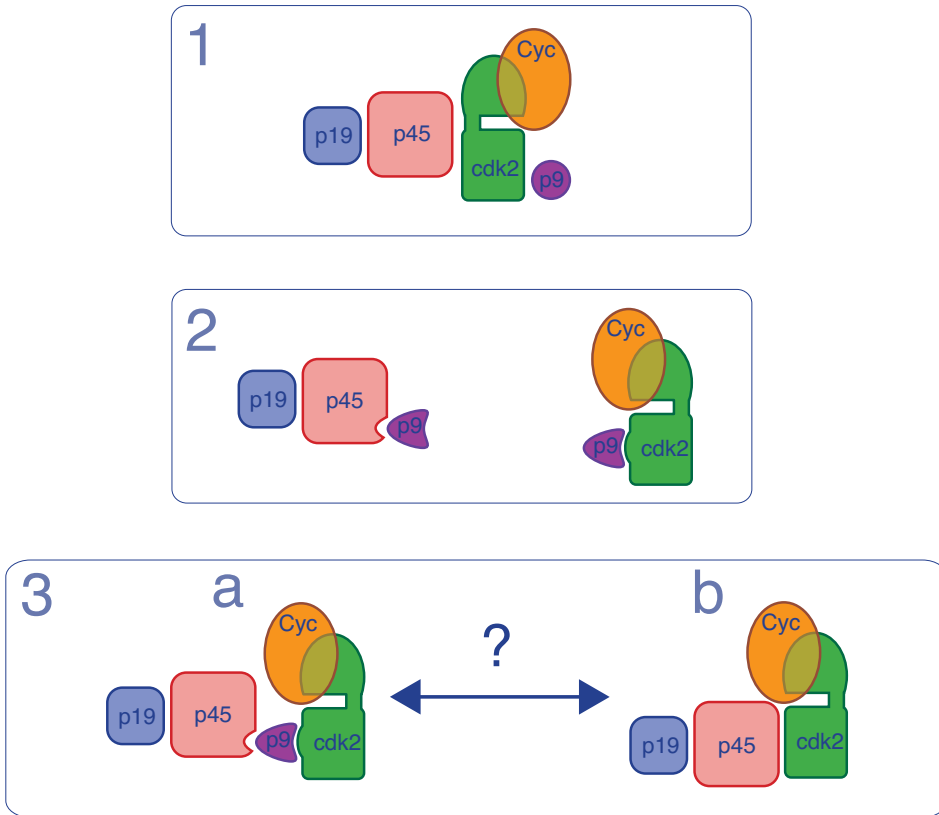


Figura 29. Possibles models estructurals dels multicomplexes ciclina/CDK2/p45^{SKP2}/p19^{SKP1}/CksHs1. (1) L'esquema mostra l'estructura dels complexos actius de fase S descrita per Zhang et al., on p45^{SKP2} i CksHs1 s'associen amb CDK2 de manera independent. (2) L'esquema proposa un primer possible model de composició dels multicomplexes de CDK2. En aquest model es contempla la coexistència de complexos p45^{SKP2}/CksHs1, ciclina/CDK2/p45^{SKP2} i ciclina/CDK2/CksHs1, on p45^{SKP2} i CksHs1 interaccionen amb ciclina/CDK2 de manera mútuament exclouent. (3) L'esquema proposa un segon possible model de composició dels multicomplexes de CDK2. En aquest model es contempla la coexistència de complexos p45^{SKP2}/CksHs1, ciclina/CDK2/CksHs1/p45^{SKP2} i ciclina/CDK2/CksHs1. En aquest model no hi ha interacció directa p45^{SKP2}-CDK2, sino que CksHs1 actua de pont entre les dues proteïnes.

CDK2, la qual cosa podria ser, per exemple, perquè CksHs1 actués bloquejant el lloc d'unió de p45^{SKP2} a la quinassa. La segona opció planteja l'associació indirecta de p45^{SKP2} amb CDK2 a través de CksHs1. L'actuació de CksHs1 com a pont d'unió entre p45^{SKP2} i CDK2 és més improbable però no pot ésser descartada amb les dades de les que disposem, ja que mitjançant *two-hybrid* no es va objectivar interacció directa i mitjançant coprecipitació no pot descartar-se la presència de CksHs1 endogen. En aquest segon cas l'augment de CksHs1 augmentaria la presència de complexos p45^{SKP2}/CksHs1 i CDK2/CksHs1 i, com en el primer cas, el p45^{SKP2} així complexat amb CksHs1 no podria unir-se a CDK2/CksHs1 i també s'inhibiria la unió p45^{SKP2}-CDK2.

Les aproximacions experimentals per a clarificar la situació van ser dues. En primer lloc es van fer experiments de coprecipitació però aquesta vegada mesurant la interacció de CksHs1 i CDK2 en presència de concentracions creixents de p45^{SKP2}. Els resultats d'aquests experiments van mostrar que l'augment de p45^{SKP2} inhibeix la unió de CksHs1 a ciclina/CDK2, és a dir, que l'associació CDK2-CksHs1 depèn de p45^{SKP2}. Aquest resultat indica que p45^{SKP2} s'uneix o bé a CksHs1 o bé a la quinassa, però no a ambdós de manera simultània. Per tant, aquest resultat afavoreix la primera opció plantejada respecte a l'estructuració dels multicomplexes de CDK2. A més, la consideració d'aquest resultat juntament amb el dels experiments anteriors, permet concloure que p45^{SKP2} i CksHs1 formen complexos amb ciclina/CDK2 de manera mútuament exclouent.

La segona aproximació experimental va consistir en l'addició de proteïna CksHs1 recombinant a precipitats de ciclina/CDK2 i en la mesura de la unió de p45^{SKP2} a aquests precipitats, en comparació amb precipitats sense proteïna afegida. Els resultats van evidenciar una millor unió de p45^{SKP2} als precipitats de CDK2 sense proteïna CksHs1 afegida. Aquest resultat indica que p45^{SKP2}, enlloc d'unir-se a CDK2 a través de CksHs1, competeix amb CksHs1 per la unió a la quinassa. Els resultats d'aquests dos experiments afavoreixen la composició dels multicomplexes de ciclina/CDK2 plantejada en la primera opció. És a dir, les dades experimentals suggereixen la coexistència de, com a mínim, dos complexos

diferents ciclina/CDK2 a més dels complexos p45^{SKP2}/CksHs1. Els dos complexos o multicomplexos ciclina/CDK2 diferents serien ciclina/CDK2/p45^{SKP2} i ciclina/CDK2/CksHs1, on p45^{SKP2} i CksHs1 s'uneixen a ciclina/CDK2 de manera mútuament excloent. A la vegada, un dels elements reguladors de la formació d'un o altre complexo ciclina/CDK2 podria ser la formació complexo p45^{SKP2}/CksHs1. El model proposat es mostra a la figura 30.

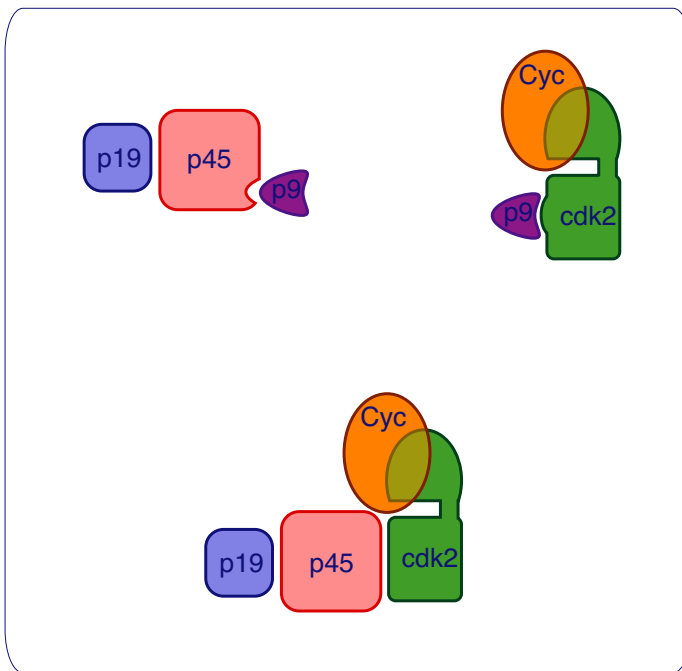


Figura 30. Model de composició i estructura dels multicomplexos de ciclina/CDK2 suggerida per les dades experimentals. L'esquema mostra la coexistència de tres complexos proteics presents en un moment concret del cicle cel·lular. CDK2 pot formar part dels complexos ciclina/CDK2/p45^{SKP2} o ciclina/CDK2/CksHs1, on p45^{SKP2} i CksHs1 s'uneixen a ciclina/CDK2 de manera mútuament excloent. Alhora, existeixen complexos p45^{SKP2}/CksHs1, els quals regulen la participació de CksHs1 i p45^{SKP2} en els complexos de CDK2.

L'establiment d'un model per a la composició i estructura dels multicomplexes de ciclina/CDK2 coherent amb les dades experimentals obtingudes va plantejar la possibilitat d'obtenir dades funcionals que aportessin consistència i alhora validesa a les dades estructurals. Malgrat estar descrita des de fa temps, la participació de p45^{SKP2} i CksHs1 en els complexos ciclina/CDK2 no ha estat descrita a nivell funcional. Actualment es considera que els complexos ciclina/CDK2 on participen ambdues molècules son actius i propis de la fase S, però la seva participació en la regulació de l'activitat de la quinassa ja sigui individual o conjuntament, no està aclarida. p45^{SKP2} ha estat àmpliament relacionat amb la funció d'ubiquïtinització, però només un parell d'estudis impliquen aquesta molècula en la funció quinassa dels complexos Ciclina A/CDK2 aportant, però, dades contradictòries (Sutterluty et al., 1999; Yam et al., 1999). Per altra banda, experiments de sobreexpressió o depleció duts a terme en llevats i granotes *xenopus* impliquen les proteïnes cks en funcions relacionades amb el cicle cel·lular com l'entrada i sortida de mitosi, la transició G1/S, la transició G2/M o la funció del APC/ciclosoma. De tota manera, la forma humana, CksHs1, tampoc ha estat mai relacionat directament amb la funció dels complexos ciclina/CDK2.

L'assaig funcional d'ús més generalitzat per a mesurar l'activitat de CDK2 és l'assaig de quinasses emprant la histona H1 com a substrat de fosforilació. Per tant, en el present estudi es van utilitzar assajos d'aquest tipus en precipitats obtinguts de cèl·lules de mamífer per a avaluar possibles canvis en l'activitat de CDK2 davant la transfecció de diferents proteïnes en aquestes cèl·lules. Els resultats d'aquests experiments van mostrar que la transfecció conjunta de CDK2 i CksHs1 es correspon amb una inhibició substancial de l'activitat quinassa de CDK2. Sorprenentment, però, quan aquests assajos es van fer afegint proteïna CksHs1 exògena a precipitats de CDK2 de cèl·lules de mamífer, no es va objectivar inhibició de l'activitat quinassa. Aquestes dades indiquen que CksHs1 té un efecte inhibitori sobre l'activitat quinassa de CDK2 en el qual la unió de CksHs1 a la quinassa és necessària però no suficient, essent el mecanisme pel qual s'exerceix aquesta funció indirecte.

L'atribució d'un mecanisme d'acció indirecte de CksHs1 sobre CDK2 s'ha fet mitjançant la comparació de l'acció inhibidora de CksHs1 amb la d'altres inhibidors com p21^{Cip1}, el mecanisme d'acció dels quals és més conegut. p21^{Cip1} és un dels membres de la família d'inhibidors universals Cip/Kip i, com a tal, exerceix una funció inhibidora sobre CDK2. p21^{Cip1} interacciona amb el complexe ciclina/CDK2 i s'ha descrit que el seu mecanisme inhibitori és directe, és a dir, causat per la interacció de l'inhibidor amb la quinassa la qual causaria, per exemple, el bloqueig del lloc d'unió al substrat. En canvi, en el cas de CksHs1 s'ha descrit que la unió amb CDK2 no causa canvis conformacionals en la quinassa i no afecta regions importants per a l'activitat d'aquesta. A més, resultats obtinguts en aquest estudi han objectivat inhibició de l'activitat quinassa de CDK2 amb la transfecció conjunta de p21^{Cip1} i CDK2 en cèl·lules de mamífer, així com amb l'addició de proteïna exògena p21^{Cip1} a precipitats de CDK2. Per tant, la comparació dels resultats obtinguts amb CksHs1 i p21^{Cip1} suggereixen que el mecanisme d'acció inhibitori de CksHs1 és indirecte. Així, el mecanisme d'acció de CksHs1 no seria degut només a l'associació i efecte de CksHs1 sobre CDK2, sinó que caldria l'acció d'un o més factors presents al lisat de naturalesa desconeguda.

Un cop objectivat l'efecte inhibidor de CksHs1 sobre l'activitat quinassa de CDK2, es van fer assajos de quinasses transfectant conjuntament CDK2, CksHs1 i p45^{SKP2} en cèl·lules de mamífer. L'objectiu d'aquests assajos era esbrinar si la formació de complexos ciclina/CDK2/p45^{SKP2} i ciclina/CDK2/CksHs1 de manera mútuament excloent mostrava conseqüències a nivell funcional. Els resultats dels experiments van mostrar que la transfecció conjunta de p45^{SKP2} i CDK2 no modificava l'activitat quinassa o, en tot cas, l'augmentava lleument. Altres resultats van mostrar també que la transfecció conjunta de p45^{SKP2} amb CDK2 i una concentració inhibidora de CksHs1 es corresponia amb un restabliment de l'activitat quinassa inhibida. Per tant, les dades experimentals mostren que, si bé p45^{SKP2} no exerceix un efecte clar sobre l'activitat de CDK2 de manera aïllada, aquesta molècula és capaç de restablir l'activitat quinassa basal inhibida per CksHs1. Aquest resultat il·lustra l'existència d'un paral·lelisme

clar entre estructura i funció. És a dir, la dualitat estructural manifestada per la formació de complexos ciclina/CDK2/p45^{SKP2} i ciclina/CDK2/CksHs1 de manera mútuament excloent es manifesta en una dualitat funcional en forma d'activació i inhibició de l'activitat quinassa de CDK2 segons aquest formi part d'un o altre complexe.

La qüestió més evident que plantegen els resultats precedents fa referència al mecanisme pel qual CksHs1 exerceix la seva acció inhibidora. Aquest mecanisme és alhora el mecanisme sobre el qual actua p45^{SKP2} per a revertir la inhibició causada per CksHs1. Les funcions i els mecanismes d'acció de les proteïnes Cks estan encara poc clars, però diversos autors han relacionat algunes formes d'aquesta família amb la modulació de l'estat de fosforilació en tirosines. Així s'ha descrit, per exemple, que la proteïna p13^{suc1} de *Schizosaccharomyces pombe* inhibeix l'activitat de la quinassa mitòtica mitjançant el bloqueig de la desfosforilació en tirosines de la quinassa (Dunphy and Newport, 1989). Fins ara cap de les formes humanes d'aquesta família s'ha relacionat amb la fosforilació en tirosines, però aquesta possibilitat és interessant tenint en compte que un dels mecanismes inhibitoris de les CDKs és la fosforilació de la Tyr-15.

Amb aquests plantejaments teòrics es van fer experiments per esbrinar si el CDK2 unit a CksHs1 té la Tyr-15 fosforilada i si el CDK2 unit a p45^{SKP2} no té la Tyr-15 fosforilada. En aquests experiments es van fer immunoblots anti-fosfotirosines en precipitats de cèl·lules de mamífer transfectades amb CDK2 i p45^{SKP2} o CksHs1. També es van emprar diversos controls per assegurar l'especificitat com, per exemple, una forma de CDK2 amb la Tyr-15 mutada o el tractament amb fosfatasa alcalina. Els resultats van mostrar que el CDK2 unit a CksHs1 presenta majoritàriament la Tyr-15 fosforilada i que el CDK2 unit a p45^{SKP2} no té la Tyr-15 fosforilada.

Així, la troballa conjunta que CksHs1 inhibeix l'activitat quinassa de CDK2 i que el CDK2 unit a CksHs1 té la Tyr-15 fosforilada suggereix que el manteniment de la Tyr-15 fosforilada pot ser el mecanisme inhibitori de CksHs1; ja sigui perquè aquest actua afavorint la fosforilació o bloquejant la desfosforilació. Aquesta

proposta és, a més, consistent amb la consideració del mecanisme inhibitori de CksHs1 com a indirecte. Així, l'estat de fosforilació de la Tyr-15 depèn d'un conjunt de quinasses i fosfatases presents en el lisat i sobre les quals podria actuar CksHs1 per a mantenir la tirosina fosforilada. En els experiments de transfecció conjunta de CDK2 i CksHs1 on hem objectivat inhibició de l'activitat quinassa, CksHs1 podria actuar sobre els factors determinants de la fosforilació de tirosines presents en el lisat. En canvi, en els experiments fets amb proteïna exògena CksHs1 afegida a precipitats de CDK2 on no es va objectivar inhibició de l'activitat quinassa, CksHs1 no podria actuar sobre els factors necessaris perquè el lisat no estaria present. En el cas de p45^{SKP2}, les dades experimentals mostren que p45^{SKP2} restableix l'activitat quinassa de CDK2 inhibida per CksHs1 i, alhora, que el CDK2 unit a p45^{SKP2} no té fosforilada la Tyr-15. Aquests resultats suggereixen que p45^{SKP2} podria afectar també l'estat de fosforilació de la Tyr-15 en sentit invers a com ho fa CksHs1 i així revertir el seu efecte inhibitori.

La integració dels resultats estructurals i funcionals exposats permeten compondre una visió dinàmica pel que fa a la formació, regulació i funció dels complexos ciclina/CDK2 en relació amb p45^{SKP2} i CksHs1. El nucli d'aquest plantejament són els complexos Ciclina A/CDK2 en un moment molt concret de la fase S del cicle, ja que en altres moments els complexos de CDK2 tenen altres integrants. En aquest moment hi hauria almenys dos tipus de complexos de Ciclina A/CDK2; Ciclina A/CDK2/CksHs1 i Ciclina A/CDK2/p45^{SKP2}. En ambdós tipus de complexos, CksHs1 i p45^{SKP2} actuarien regulant CDK2 i la presència predominant d'un o altre complexe determinaria l'activitat de la quinassa. Els complexos Ciclina A/CDK2/CksHs1 tenen la CDK2 inhibida i els complexos Ciclina A/CDK2/p45^{SKP2} la tenen activa. Aquests dos tipus de complexos coexisteixen i la seva abundància relativa depèn de les necessitats del moment pel que fa a l'activitat quinassa de CDK2. La regulació de l'abundància d'un o altre complexe es fa a través de la formació d'un tercer tipus de complexos, p45^{SKP2}/CksHs1. Així, la proteïna més abundant forma complexos amb CDK2 i alhora segresta a l'altre, evitant que es complexi amb CDK2. Finalment, la proteïna més abundant és la que de forma predominant forma complexos

amb ciclina/CDK2 i qui determina l'activitat quinassa de CDK2. En aquest context, doncs, la interacció p45^{SKP2}-CksHs1 té un important paper regulador en la formació i activitat dels complexos ciclina/CDK2. De tota manera, no pot excloure's la implicació funcional del complex p45^{SKP2}/CksHs1 en la regulació d'altres processos del cicle cel·lular.

Les nostres dades aporten noves evidències que il·lustren la creixent importància que està adquirint p45^{SKP2} en la regulació de la inducció i progressió de la fase S. Així doncs, considerant les dades presents a la literatura i les dades aportades pel nostre estudi, actualment pot considerar-se la regulació exercida per p45^{SKP2} en la progressió del cicle cel·lular a tres nivells; la ubiquïtinització i degradació de proteïnes reguladores i efectores mitjançant el complex SCF^{SKP2}, la promoció de l'augment de Ciclina A i la regulació de l'activitat quinassa dels complexos Ciclina A/CDK2 mitjançant la modulació de l'associació CDK2-CksHs1.

Cal dir que en el moment de finalitzar aquest estudi, altres autors van descriure la interacció p45^{SKP2}-CksHs1 (Ganoth et al., 2001). El treball d'aquests autors descriu que per a la ubiquïtinització de p27^{kip1} dependent del complex SCF^{SKP2} cal l'acció de CksHs1 el qual s'associa amb p45^{SKP2}. Posteriorment un article de revisió també incideix sobre el tema (Bartek and Lukas, 2001), hipotetitzant que l'associació de CksHs1 amb p45^{SKP2} podria conferir un canvi al·lostèric a p45^{SKP2} que augmentés la seva afinitat pel p27^{Cip1} en forma fosforilada. El resultat del treball d'aquests autors confirma les dades del nostre treball referents a l'existència d'interacció proteica entre p45^{SKP2} i CksHs1. Aquests autors, però emmarquen funcionalment aquesta interacció en el paper de p45^{SKP2} com a *F-box protein* actuant en la ubiquïtinització i degradació de p27^{Cip1}. En el nostre estudi, en canvi, es descriu aquesta mateixa interacció a nivell molecular i s'implica en la funció de p45^{SKP2} com a proteïna reguladora dels complexos Ciclina A/CDK2 juntament amb CksHs1, funció que es descriu i s'analitza. Així, els resultats dels treballs de Ganoth, Spruck, Bartek i col·laboradors i els resultats del nostre treball es complementen i no fan sinó augmentar la significància de les proteïnes p45^{SKP2} i CksHs1 en la regulació de les fases G1 i S del cicle cel·lular.

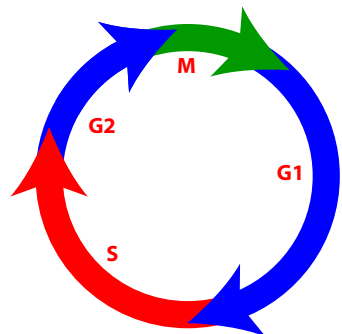
Paral·lelament a la descripció de la interacció p45^{SKP2}-CksHs1 a nivell estructural i funcional, aquest estudi ha permès descriure altres interactors de p45^{SKP2}. Un d'aquests interactors és GATE-16^{GEF2} (*Golgi-associated ATPase Enhancer*), una proteïna citosòlica de 16 KDa que funciona com a factor de transport soluble (Legesse-Miller et al., 1998; Paz et al., 2000; Sagiv et al., 2000). El cDNA corresponent a GATE-16 va ser clonat a partir d'un *screening* fet amb la tècnica *Interaction-trap* a partir d'una llibreria de limfòcits humans. La interacció va ser confirmada *in vivo* mitjançant coprecipitació en cèl·lules de mamífer.

Un altre dels interactors de p45^{SKP2} descrits en aquest treball és la proteïna que hem anomenat c-89, proteïna d'uns 15 KDa amb dos dominis hidrofòbics predits a partir de la seva seqüència, però d'estructura i funció totalment desconegudes. La seqüència de la proteïna c-89 està descrita a les bases de dades amb el nom de RAB 5-*Interacting protein*, però sense cap suport bibliogràfic que en justifiqui la nomenclatura. El cDNA corresponent a aquesta proteïna va ser clonat en un *Interactor-hunt* emprant una llibreria de cèl·lules HeLa. La interacció va ésser també confirmada *in vivo* mitjançant coprecipitació en cèl·lules de mamífer. A més, estudis d'immunofluorescència *in vivo* en cèl·lules de mamífer van permetre objectivar la colocalització de p45^{SKP2} i proteïna c-89 en agregats perinuclears. D'una banda, aquesta troballa és una altra dada confirmatòria de la interacció entre les dues proteïnes, però, a més, aquesta troballa il·lustra una significància funcional clara entre les dues proteïnes, significància que haurà d'ésser estudiada en futurs treballs.

Així doncs, el nostre treball ha permès descriure, a més de la interacció p45^{SKP2}-CksHs1, les noves interaccions p45^{SKP2}-GATE-16^{GEF2} i p45^{SKP2}-89. A diferència de CksHs1, aquests dos últims interactors de p45^{SKP2} no han estat estudiats en profunditat a nivell estructural i funcional, però les dades obtingudes referents a la colocalització de p45^{SKP2} i proteïna 89 en agregats perinuclears son especialment interessants i suggestives. Per tant, la descripció d'aquestes noves interaccions planteja noves i interessants qüestions pel que fa a la possible implicació funcional d'aquestes associacions en la regulació del cicle cel·lular o al possible paper de

p45^{SKP2} en altres processos diferents del cicle cel·lular. En tot cas, els resultats del nostre treball han aportat dades que permeten l'estudi de la funció de p45^{SKP2} com a regulador del cicle cel·lular des d'una nova perspectiva estructural i funcional.

VI. CONCLUSIONS



1. CksHs1 és una proteïna interactora de p45^{SKP2}. CksHs1 s'ha identificat com a interactor de p45^{SKP2} mitjançant la tècnica *Interaction-trap*, un sistema *two-hybrid* realitzat en llevats. La interacció s'ha confirmat *in vivo* mitjançant coimmunoprecipitació en les línies cel·lulars humanes Jurkat i Cem i coprecipitació en cèl·lules de mamífer Cos-7. A més, s'ha descrit que el domini carboxi-terminal de p45^{SKP2} (aminoàcids 153 a 436) és el que s'associa directament amb la proteïna CksHs1.

2. La interacció CksHs1-p45^{SKP2} està implicada en la formació dels multicomplexes de Ciclina A/CDK2. En aquest context, s'ha descrit que la zona de CksHs1 necessària per a la interacció amb p45^{SKP2} està compresa entre els aminoàcids 36 a 71 de CksHs1 i, per tant, que les zones de CksHs1 que interaccionen amb CDK2 i p45^{SKP2}, són diferents.

3. p45^{SKP2} i CksHs1 formen part dels complexos Ciclina A/CDK2 de manera mútuament exclouent i la interacció CksHs1-p45^{SKP2} bloqueja l'associació de p45^{SKP2} amb els esmentats complexos de CDK2.

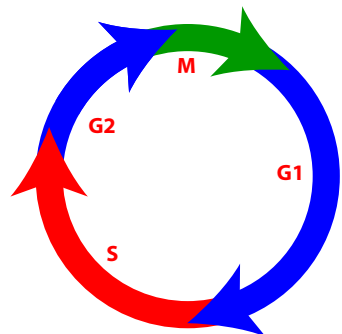
4. La interacció CksHs1-p45^{SKP2} té efectes funcionals en els complexos Ciclina A/CDK2. La sobreexpressió de CksHs1 inhibeix l'activitat quinassa de CDK2 i la sobreexpressió de p45^{SKP2} restableix l'activitat quinassa basal de CDK2 inhibida per CksHs1.

5. L'acció de CksHs1 i p45^{SKP2} pot exercir-se a nivell de la Tyr-15 de CDK2, ja que el CDK2 unit a CksHs1 té la Tyr-15 fosforilada i el CDK2 unit a p45^{SKP2} no té la Tyr-15 fosforilada.

6. GATE-16^{GEF2} és una proteïna interactora de p45^{SKP2}. GATE-16^{GEF2} s'ha identificat com a interactor de p45^{SKP2} mitjançant la tècnica *Interaction-trap*. La interacció s'ha confirmat *in vivo* mitjançant coprecipitació en cèl·lules de mamífer Cos-7.

7. c-89 és una proteïna interactora de p45^{SKP2}. La proteïna c-89 s'ha identificat com a interactor de p45^{SKP2} mitjançant la tècnica *Interaction-trap*. La interacció s'ha confirmat *in vivo* mitjançant coprecipitació en cèl·lules de mamífer Cos-7. A més, s'ha objectivat que la proteïna c-89 és una proteïna de localització cel·lular predominantment citoplasmàtica, a diferència de p45^{SKP2}, CDK2, CksHs1 i GATE-16^{GEF2} les quals son proteïnes de localització cel·lular predominantment nuclear. S'ha mosrat també que la proteïna p45^{SKP2} i la proteïna c-89 colocalitzen en forma d'agregats de distribució cel·lular perinuclear.

VII. BIBLIOGRAFIA



Bibliografia

- Adams, P.D. and Kaelin, W.G. (1995) Transcriptional control by E2F. *Semin Cancer Biol*, **6**, 99-108.
- Aktas, H., Cai, H. and Cooper, G.M. (1997) Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1. *Mol Cell Biol*, **17**, 3850-7.
- Albanese, C., Johnson, J., Watanabe, G., Eklund, N., Vu, D., Arnold, A. and Pestell, R.G. (1995) Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J Biol Chem*, **270**, 23589-97.
- Arvai, A.S., Bourne, Y., Hickey, M.J. and Tainer, J.A. (1995a) Crystal structure of the human cell cycle protein CksHs1: single domain fold with similarity to kinase N-lobe domain. *J Mol Biol*, **249**, 835-42.
- Arvai, A.S., Bourne, Y., Williams, D., Reed, S.I. and Tainer, J.A. (1995b) Crystallization and preliminary crystallographic study of human CksHs1: a cell cycle regulatory protein. *Proteins*, **21**, 70-3.
- Assoian, R.K. (1997) Anchorage-dependent cell cycle progression. *J Cell Biol*, **136**, 1-4.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (eds.) (1987-1994) *Current Protocols in Molecular Biology*. (New York: John Wiley and Sons).
- Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., Goebel, M., Harper, J.W. and Elledge, S.J. (1996) SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell*, **86**, 263-74.
- Baldi, A., De Luca, A., Claudio, P.P., Baldi, F., Giordano, G.G., Tommasino, M., Paggi, M.G. and Giordano, A. (1995) The RB2/p130 gene product is a nuclear protein whose phosphorylation is cell cycle regulated. *J Cell Biochem*, **59**, 402-8.
- Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M.J., Pagano, M. and Draetta, G. (1993) Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev*, **7**, 812-21.
- Bandara, L.R., Adamczewski, J.P., Hunt, T. and La Thangue, N.B. (1991) Cyclin A and the retinoblastoma gene product complex with a common transcription factor. *Nature*, **352**, 249-51.

- Bandara, L.R., Adamczewski, J.P., Zamanian, M., Poon, R.Y., Hunt, T. and Thangue, N.B. (1992) Cyclin A recruits p33cdk2 to the cellular transcription factor DRTF1. *J Cell Sci Suppl*, **16**, 77-85.
- Bartek, J., Bartkova, J. and Lukas, J. (1996) The retinoblastoma protein pathway and the restriction point. *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 805-14.
- Bartek, J. and Lukas, J. (2001) p27 destruction: Cks1 pulls the trigger. *Nat Cell Biol*, **3**, E95-7.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-23.
- Bourne, Y., Watson, M.H., Arvai, A.S., Bernstein, S.L., Reed, S.I. and Tainer, J.A. (2000) Crystal structure and mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle regulatory protein Cks1: implications for domain swapping, anion binding and protein interactions [In Process Citation]. *Structure Fold Des*, **8**, 841-50.
- Bourne, Y., Watson, M.H., Hickey, M.J., Holmes, W., Rocque, W., Reed, S.I. and Tainer, J.A. (1996) Crystal structure and mutational analysis of the human CDK2 kinase complex with cell cycle-regulatory protein CksHs1. *Cell*, **84**, 863-74.
- Brizuela, L., Draetta, G. and Beach, D. (1987) p13suc1 acts in the fission yeast cell division cycle as a component of the p34cdc2 protein kinase. *Embo J*, **6**, 3507-14.
- Brown, A.J., Jones, T. and Shuttleworth, J. (1994) Expression and activity of p40MO15, the catalytic subunit of cdk-activating kinase, during *Xenopus* oogenesis and embryogenesis. *Mol Biol Cell*, **5**, 921-32.
- Brown, N.R., Noble, M.E., Endicott, J.A., Garman, E.F., Wakatsuki, S., Mitchell, E., Rasmussen, B., Hunt, T. and Johnson, L.N. (1995) The crystal structure of cyclin A. *Structure*, **3**, 1235-47.
- Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J.I., Beach, D., Jacks, T. and Hannon, G.J. (1995) Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature*, **377**, 552-7.
- Bush, A., Mateyak, M., Dugan, K., Obaya, A., Adachi, S., Sedivy, J. and Cole, M. (1998) c-myc null cells misregulate cad and gadd45 but not other proposed c-Myc targets. *Genes Dev*, **12**, 3797-802.

- Cao, L., Faha, B., Dembski, M., Tsai, L.H., Harlow, E. and Dyson, N. (1992) Independent binding of the retinoblastoma protein and p107 to the transcription factor E2F. *Nature*, **355**, 176-9.
- Cardoso, M.C., Leonhardt, H. and Nadal-Ginard, B. (1993) Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication: cyclin A and Cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication. *Cell*, **74**, 979-92.
- Carrano, A.C., Eytan, E., Hershko, A. and Pagano, M. (1999) SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol*, **1**, 193-9.
- Cenciarelli, C., Chiaur, D.S., Guardavaccaro, D., Parks, W., Vidal, M. and Pagano, M. (1999) Identification of a family of human F-box proteins. *Curr Biol*, **9**, 1177-9.
- Chan, F.K., Zhang, J., Cheng, L., Shapiro, D.N. and Winoto, A. (1995) Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4. *Mol Cell Biol*, **15**, 2682-8.
- Charrasse, S., Carena, I., Brondani, V., Klempnauer, K.H. and Ferrari, S. (2000) Degradation of B-Myb by ubiquitin-mediated proteolysis: involvement of the Cdc34-SCF(p45Skp2) pathway. *Oncogene*, **19**, 2986-95.
- Chellappan, S.P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J.M. and Nevins, J.R. (1991) The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell*, **65**, 1053-61.
- Chen, J., Jackson, P.K., Kirschner, M.W. and Dutta, A. (1995) Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature*, **374**, 386-8.
- Chen, J., Saha, P., Kornbluth, S., Dynlacht, B.D. and Dutta, A. (1996) Cyclin-binding motifs are essential for the function of p21CIP1. *Mol Cell Biol*, **16**, 4673-82.
- Cheng, M., Olivier, P., Diehl, J.A., Fero, M., Roussel, M.F., Roberts, J.M. and Sherr, C.J. (1999) The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *Embo J*, **18**, 1571-83.
- Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R. and Fields, S. (1991) The two hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a

- protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **88**, 9578-9582.
- Ciechanover, A. (1994) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*, **79**, 13-21.
- Claudio, P.P., De Luca, A., Howard, C.M., Baldi, A., Firpo, E.J., Koff, A., Paggi, M.G. and Giordano, A. (1996) Functional analysis of pRb2/p130 interaction with cyclins. *Cancer Res*, **56**, 2003-8.
- Connell-Crowley, L., Solomon, M.J., Wei, N. and Harper, J.W. (1993) Phosphorylation independent activation of human cyclin-dependent kinase 2 by cyclin A in vitro. *Mol Biol Cell*, **4**, 79-92.
- Dalton, S. (1992) Cell cycle regulation of the human cdc2 gene. *Embo J*, **11**, 1797-804.
- Dalton, S. and Treisman, R. (1992) Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. *Cell*, **68**, 597-612.
- Dang, C.V. (1999) c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol*, **19**, 1-11.
- De Bondt, H.L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H.D., Morgan, D.O. and Kim, S.H. (1993) Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature*, **363**, 595-602.
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J. and Leder, P. (1995) Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell*, **82**, 675-84.
- Desai, D., Wessling, H.C., Fisher, R.P. and Morgan, D.O. (1995) Effects of phosphorylation by CAK on cyclin binding by CDC2 and CDK2. *Mol Cell Biol*, **15**, 345-50.
- Deshaies, R.J. (1999) SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 435-67.
- Deshaies, R.J., Chau, V. and Kirschner, M. (1995) Ubiquitination of the G1 cyclin Cln2p by a Cdc34p-dependent pathway. *Embo J*, **14**, 303-12.
- Devoto, S.H., Mudryj, M., Pines, J., Hunter, T. and Nevins, J.R. (1992) A cyclin A-protein kinase complex possesses sequence-specific DNA binding activity: p33cdk2 is a component of the E2F-cyclin A complex. *Cell*, **68**, 167-76.
- Di Cristofano, A., De Acetis, M., Koff, A., Cordon-Cardo, C. and P, P.P. (2001)

- Pten and p27KIP1 cooperate in prostate cancer tumor suppression in the mouse. *Nat Genet*, **27**, 222-224.
- Diehl, J.A., Zindy, F. and Sherr, C.J. (1997) Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev*, **11**, 957-72.
- Dou, Q.P., Markell, P.J. and Pardee, A.B. (1992) Thymidine kinase transcription is regulated at G1/S phase by a complex that contains retinoblastoma-like protein and a cdc2 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 3256-60.
- Dowdy, S.F., Hinds, P.W., Louie, K., Reed, S.I., Arnold, A. and Weinberg, R.A. (1993) Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell*, **73**, 499-511.
- Draetta, G., Brizuela, L., Potashkin, J. and Beach, D. (1987) Identification of p34 and p13, human homologs of the cell cycle regulators of fission yeast encoded by *cdc2+* and *suc1+*. *Cell*, **50**, 319-25.
- Drobnjak, M., Osman, I., Scher, H.I., Fazzari, M. and Cordon-Cardo, C. (2000) Overexpression of cyclin D1 is associated with metastatic prostate cancer to bone. *Clin Cancer Res*, **6**, 1891-5.
- Druker, B.J., Mamon, H.J. and Roberts, T.M. (1989) Oncogenes, growth factors, and signal transduction. *N Engl J Med*, **321**, 1383-91.
- Ducommun, B., Brambilla, P., Felix, M.A., Franza, B.R., Karsenti, E. and Draetta, G. (1991) *cdc2* phosphorylation is required for its interaction with cyclin. *Embo J*, **10**, 3311-9.
- Dulic, V., Kaufmann, W.K., Wilson, S.J., Tlsty, T.D., Lees, E., Harper, J.W., Elledge, S.J. and Reed, S.I. (1994) p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell*, **76**, 1013-23.
- Dulic, V., Lees, E. and Reed, S.I. (1992) Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science*, **257**, 1958-61.
- Dunphy, W.G. and Newport, J.W. (1989) Fission yeast p13 blocks mitotic activation and tyrosine dephosphorylation of the *Xenopus cdc2* protein kinase. *Cell*, **58**, 181-91.
- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P.L., Yeh, S.H., Yang, Y., Kilburn, A.E., Lee, W.H. and Elledge, S.J. (1993) The retinoblastoma protein associates with the

- protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev*, 7, 555-69.
- Dynlacht, B.D., Flores, O., Lees, J.A. and Harlow, E. (1994) Differential regulation of E2F transactivation by cyclin/cdk2 complexes. *Genes Dev*, 8, 1772-86.
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75, 817-25.
- Elledge, S.J. (1996) Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science*, 274, 1664-72.
- Elledge, S.J. and Harper, J.W. (1998) The role of protein stability in the cell cycle and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1377, M61-70.
- Embury, S.H., Scharf, S.J., Saiki, R.K., Ghoslon, M.A., Golbus, M., Arnheim, N. and Erlich, H.A. (1987) Rapid prenatal diagnosis of sickle cell anemia by a new method of DNA analysis. *N Engl J Med*, 316, 656-61.
- Evan, G.I., Lewis, G.K., Ramsay, G. and Bishop, J.M. (1985) Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol*, 5, 3610-6.
- Ewen, M.E. (1994) The cell cycle and the retinoblastoma protein family. *Cancer Metastasis Rev*, 13, 45-66.
- Ewen, M.E., Faha, B., Harlow, E. and Livingston, D.M. (1992) Interaction of p107 with cyclin A independent of complex formation with viral oncoproteins. *Science*, 255, 85-7.
- Faha, B., Ewen, M.E., Tsai, L.H., Livingston, D.M. and Harlow, E. (1992) Interaction between human cyclin A and adenovirus E1A-associated p107 protein. *Science*, 255, 87-90.
- Fang, F. and Newport, J.W. (1991) Evidence that the G1-S and G2-M transitions are controlled by different cdc2 proteins in higher eukaryotes. *Cell*, 66, 731-42.
- Fields, S. and Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340, 245-6.
- Filmus, J., Robles, A.I., Shi, W., Wong, M.J., Colombo, L.I. and Conti, C.J. (1994) Induction of cyclin D1 overexpression by activated ras. *Oncogene*, 9, 3627-33.

- Fisher, R.P. and Morgan, D.O. (1994) A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell*, **78**, 713-24.
- Ganoth, D., Bornstein, G., Ko, T.K., Larsen, B., Tyers, M., Pagano, M. and Hershko, A. (2001) The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCFSkp2-mediated ubiquitinylation of p27. *Nat Cell Biol*, **3**, 321-324.
- Geng, Y., Eaton, E.N., Picon, M., Roberts, J.M., Lundberg, A.S., Gifford, A., Sardet, C. and Weinberg, R.A. (1996) Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene*, **12**, 1173-80.
- Giordano, A., Lee, J.H., Scheppler, J.A., Herrmann, C., Harlow, E., Deuschle, U., Beach, D. and Franza, B.R. (1991) Cell cycle regulation of histone H1 kinase activity associated with the adenoviral protein E1A. *Science*, **253**, 1271-5.
- Giordano, A., Whyte, P., Harlow, E., Franza, B.R., Beach, D. and Draetta, G. (1989) A 60 kd cdc2-associated polypeptide complexes with the E1A proteins in adenovirus-infected cells. *Cell*, **58**, 981-90.
- Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A. and Lamb, N.J. (1991) Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell*, **67**, 1169-79.
- Glotzer, M., Murray, A.W. and Kirschner, M.W. (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*, **349**, 132-8.
- Gluzman, Y. (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, **23**, 175-82.
- Gu, M., Warshawsky, I. and Majerus, P.W. (1992) Cloning and expression of a cytosolic megakaryocyte protein-tyrosine-phosphatase with sequence homology to retinaldehyde-binding protein and yeast SEC 14p. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 2980-2984.
- Gu, Y., Turck, C.W. and Morgan, D.O. (1993) Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature*, **366**, 707-10.
- Guan, K.L., Jenkins, C.W., Li, Y., Nichols, M.A., Wu, X., O'Keefe, C.L., Matera, A.G. and Xiong, Y. (1994) Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev*, **8**, 2939-52.
- Guarente, L. (1983) Yeast promoters and lacZ fusions designed to study

- expression of cloned genes in yeast. *Methods Enzymol*, **101**, 181-91.
- Guarente, L., Lauer, G., Roberts, T.M. and Ptashne, M. (1980) Improved methods for maximizing expression of a cloned gene: a bacterium that synthesizes rabbit beta-globin. *Cell*, **20**, 543-53.
- Gubler, U. and Hoffman, B.J. (1983) A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene*, **25**, 263-9.
- Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H. and Brent, R. (1993) Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell*, **75**, 791-803.
- Hadwiger, J.A., Wittenberg, C., Mendenhall, M.D. and Reed, S.I. (1989) The *Saccharomyces cerevisiae* CKS1 gene, a homolog of the *Schizosaccharomyces pombe* *suc1+* gene, encodes a subunit of the Cdc28 protein kinase complex. *Mol Cell Biol*, **9**, 2034-41.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-80.
- Hannon, G.J. and Beach, D. (1994) p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest [see comments]. *Nature*, **371**, 257-61.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S.J. (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, **75**, 805-16.
- Hayles, J., Beach, D., Durkacz, B. and Nurse, P. (1986) The fission yeast cell cycle control gene *cdc2*: isolation of a sequence *suc1* that suppresses *cdc2* mutant function. *Mol Gen Genet*, **202**, 291-3.
- Helin, K., Harlow, E. and Fattaey, A. (1993) Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol*, **13**, 6501-8.
- Hemdan, E.S. and Porath, J. (1985) Development of Immobilized Metal Affinity Chromatography II. *J. Chromatography*, 255-264.
- Henriksson, M. and Luscher, B. (1996) Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res*, **68**, 109-82.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, **67**, 425-79.
- Hershko, A., Ganoh, D., Sudakin, V., Dahan, A., Cohen, L.H., Luca, F.C., Ruderman, J.V. and Eytan, E. (1994) Components of a system that ligates

- cyclin to ubiquitin and their regulation by the protein kinase cdc2. *J Biol Chem*, **269**, 4940-6.
- Hindley, J., Phear, G., Stein, M. and Beach, D. (1987) Suc1+ encodes a predicted 13-kilodalton protein that is essential for cell viability and is directly involved in the division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*, **7**, 504-11.
- Hinds, P.W., Mittnacht, S., Dulic, V., Arnold, A., Reed, S.I. and Weinberg, R.A. (1992) Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell*, **70**, 993-1006.
- Hirai, H., Roussel, M.F., Kato, J.Y., Ashmun, R.A. and Sherr, C.J. (1995) Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol*, **15**, 2672-81.
- Hoffman, C.S. and Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, **57**, 267-72.
- Hope, I.A. and Struhl, K. (1986) Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell*, **46**, 885-94.
- Hunkapiller, M.W. and Lujan, E. (1986) *Purification of microgram quantities of proteins by polyacrilamide gel electrophoresis*. Humana Press, Clifton, NJ.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol*, **153**, 163-8.
- Jaumot, M., Agell, N. and Bachs, O. (1996) Putative nuclear cdk2 substrates in normal and transformed cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **219**, 560-4.
- Jaumot, M., Estanol, J.M., Casanovas, O., Grana, X., Agell, N. and Bachs, O. (1997) The cell cycle inhibitor p21CIP is phosphorylated by cyclin A-CDK2 complexes. *Biochem Biophys Res Commun*, **241**, 434-8.
- Jeffrey, P.D., Russo, A.A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J. and Pavletich, N.P. (1995) Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex [see comments]. *Nature*, **376**, 313-20.
- Kaiser, P., Moncollin, V., Clarke, D.J., Watson, M.H., Bertolaet, B.L., Reed, S.I. and Bailly, E. (1999) Cyclin-dependent kinase and Cks/Suc1 interact with the proteasome in yeast to control proteolysis of M-phase targets. *Genes Dev*, **13**, 1190-202.
- Karlseder, J., Rotheneder, H. and Wintersberger, E. (1996) Interaction of Sp1

- with the growth- and cell cycle-regulated transcription factor E2F. *Mol Cell Biol*, **16**, 1659-67.
- Keegan, L., Gill, G. and Ptashne, M. (1986) Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science*, **231**, 699-704.
- Kelly, K. and Siebenlist, U. (1986) The regulation and expression of c-myc in normal and malignant cells. *Annu Rev Immunol*, **4**, 317-38.
- Kerkhoff, E. and Rapp, U.R. (1997) Induction of cell proliferation in quiescent NIH 3T3 cells by oncogenic c-Raf-1. *Mol Cell Biol*, **17**, 2576-86.
- Kim, S.H., Cho, N.H., Tallini, G., Dudas, M., Lewis, J.J. and Cordon-Cardo, C. (2001) Prognostic role of cyclin D1 in retroperitoneal sarcomas. *Cancer*, **91**, 428-434.
- King, R.W., Peters, J.M., Tugendreich, S., Rolfe, M., Hieter, P. and Kirschner, M.W. (1995) A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell*, **81**, 279-88.
- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I. and Khorana, H.G. (1971) Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol*, **56**, 341-61.
- Ko, L.J. and Prives, C. (1996) p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev*, **10**, 1054-72.
- Kobayashi, H., Stewart, E., Poon, R., Adamczewski, J.P., Gannon, J. and Hunt, T. (1992) Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits. *Mol Biol Cell*, **3**, 1279-94.
- Kobe, B. and Deisenhofer, J. (1995) A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature*, **374**, 183-6.
- Koepp, D.M., Harper, J.W. and Elledge, S.J. (1999) How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell*, **97**, 431-4.
- Koff, A., Giordano, A., Desai, D., Yamashita, K., Harper, J.W., Elledge, S., Nishimoto, T., Morgan, D.O., Franza, B.R. and Roberts, J.M. (1992) Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science*, **257**, 1689-94.
- Kouzarides, T. (1995) Transcriptional control by the retinoblastoma protein.

- Semin Cancer Biol*, **6**, 91-8.
- Krek, W. (1998) Proteolysis and the G1-S transition: the SCF connection. *Curr Opin Genet Dev*, **8**, 36-42.
- Krek, W., Ewen, M.E., Shirodkar, S., Arany, Z., Kaelin, W.G. and Livingston, D.M. (1994) Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. *Cell*, **78**, 161-72.
- Krek, W. and Nigg, E.A. (1991) Differential phosphorylation of vertebrate p34cdc2 kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: identification of major phosphorylation sites. *Embo J*, **10**, 305-16.
- Krude, T., Jackman, M., Pines, J. and Laskey, R.A. (1997) Cyclin/Cdk-dependent initiation of DNA replication in a human cell-free system. *Cell*, **88**, 109-19.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- Lahav-Baratz, S., Sudakin, V., Ruderman, J.V. and Hershko, A. (1995) Reversible phosphorylation controls the activity of cyclosome-associated cyclin-ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9303-7.
- Lavoie, J.N., L'Allemain, G., Brunet, A., Muller, R. and Pouyssegur, J. (1996) Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem*, **271**, 20608-16.
- Lee, J.O., Rieu, P., Arnaout, M.A. and Liddington, R. (1995) Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell*, **80**, 631-8.
- Lees, E., Faha, B., Dulic, V., Reed, S.I. and Harlow, E. (1992) Cyclin E/cdk2 and cyclin A/cdk2 kinases associate with p107 and E2F in a temporally distinct manner. *Genes Dev*, **6**, 1874-85.
- Lees, E.M. and Harlow, E. (1993) Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase. *Mol Cell Biol*, **13**, 1194-201.
- Legesse-Miller, A., Sagiv, Y., Porat, A. and Elazar, Z. (1998) Isolation and characterization of a novel low molecular weight protein involved in intra-Golgi traffic. *J Biol Chem*, **273**, 3105-9.
- Lew, D.J. and Kornbluth, S. (1996) Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 795-804.

- Lim, L., Manser, E., Leung, T. and Hall, C. (1996) Regulation of phosphorylation pathways by p21 GTPases. The p21 Ras- related Rho subfamily and its role in phosphorylation signalling pathways. *Eur J Biochem*, **242**, 171-85.
- Lisztwan, J., Marti, A., Sutterluty, H., Gstaiger, M., Wirbelauer, C. and Krek, W. (1998) Association of human CUL-1 and ubiquitin-conjugating enzyme CDC34 with the F-box protein p45(SKP2): evidence for evolutionary conservation in the subunit composition of the CDC34-SCF pathway. *Embo J*, **17**, 368-83.
- Luca, F.C., Shibuya, E.K., Dohrmann, C.E. and Ruderman, J.V. (1991) Both cyclin A delta 60 and B delta 97 are stable and arrest cells in M-phase, but only cyclin B delta 97 turns on cyclin destruction. *Embo J*, **10**, 4311-20.
- Lucas, J.J., Szepesi, A., Domenico, J., Tordai, A., Terada, N. and Gelfand, E.W. (1995) Differential regulation of the synthesis and activity of the major cyclin-dependent kinases, p34cdc2, p33cdk2, and p34cdk4, during cell cycle entry and progression in normal human T lymphocytes. *J Cell Physiol*, **165**, 406-16.
- Ludin, B., Doll, T., Meili, R., Kaech, S. and Matus, A. (1996) Application of novel vectors for GFP-tagging of proteins to study microtubule-associated proteins. *Gene*, **173**, 107-11.
- Lyapina, S.A., Correll, C.C., Kipreos, E.T. and Deshaies, R.J. (1998) Human CUL1 forms an evolutionarily conserved ubiquitin ligase complex (SCF) with SKP1 and an F-box protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7451-6.
- Ma, J. and Ptashne, M. (1988) Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. *Cell*, **55**, 443-6.
- Makela, T.P., Tassan, J.P., Nigg, E.A., Frutiger, S., Hughes, G.J. and Weinberg, R.A. (1994) A cyclin associated with the CDK-activating kinase MO15. *Nature*, **371**, 254-7.
- Maki, C.G. and Howley, P.M. (1997) Ubiquitination of p53 and p21 is differentially affected by ionizing and UV radiation. *Mol Cell Biol*, **17**, 355-63.
- Marshall, J., Molloy, R., Moss, G.W., Howe, J.R. and Hughes, T.E. (1995) The jellyfish green fluorescent protein: a new tool for studying ion channel expression and function. *Neuron*, **14**, 211-5.
- Marti, A., Wirbelauer, C., Scheffner, M. and Krek, W. (1999) Interaction

- between ubiquitin-protein ligase SCFSKP2 and E2F-1 underlies the regulation of E2F-1 degradation [see comments]. *Nat Cell Biol*, **1**, 14-9.
- Matsuoka, M., Kato, J.Y., Fisher, R.P., Morgan, D.O. and Sherr, C.J. (1994) Activation of cyclin-dependent kinase 4 (cdk4) by mouse MO15-associated kinase. *Mol Cell Biol*, **14**, 7265-75.
- Matsuoka, S., Edwards, M.C., Bai, C., Parker, S., Zhang, P., Baldini, A., Harper, J.W. and Elledge, S.J. (1995) p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev*, **9**, 650-62.
- Mayol, X. and Grana, X. (1997) pRB, p107 and p130 as transcriptional regulators: role in cell growth and differentiation. *Prog Cell Cycle Res*, **3**, 157-69.
- Mayol, X., Grana, X., Baldi, A., Sang, N., Hu, Q. and Giordano, A. (1993) Cloning of a new member of the retinoblastoma gene family (pRb2) which binds to the E1A transforming domain. *Oncogene*, **8**, 2561-6.
- McCarthy, R.E., Junius, V., Farber, S., Lazarus, H. and Foley, G.E. (1965) Cytogenetic analysis of human lymphoblasts in continuous culture. *Exp Cell Res*, **40**, 197-200.
- Means, A.L., Slansky, J.E., McMahan, S.L., Knuth, M.W. and Farnham, P.J. (1992) The HIP1 binding site is required for growth regulation of the dihydrofolate reductase gene promoter. *Mol Cell Biol*, **12**, 1054-63.
- Medley, Q.G., Serra-Pages, C., Iannotti, E., Seipel, K., Tang, M., O'Brien, S.P. and Streuli, M. (2000) The Trio Guanine Nucleotide Exchange Factor Is a RhoA Target. BINDING OF RhoA TO THE TRIO IMMUNOGLOBULIN-LIKE DOMAIN. *J Biol Chem*, **275**, 36116-36123.
- Michel, J.J. and Xiong, Y. (1998) Human CUL-1, but not other cullin family members, selectively interacts with SKP1 to form a complex with SKP2 and cyclin A. *Cell Growth Differ*, **9**, 435-49.
- Moberg, K., Starz, M.A. and Lees, J.A. (1996) E2F-4 switches from p130 to p107 and pRB in response to cell cycle reentry. *Mol Cell Biol*, **16**, 1436-49.
- Moran, E. (1993) DNA tumor virus transforming proteins and the cell cycle. *Curr Opin Genet Dev*, **3**, 63-70.
- Moreno, S., Hayles, J. and Nurse, P. (1989) Regulation of p34cdc2 protein kinase

- during mitosis. *Cell*, **58**, 361-72.
- Morgan, D.O. (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **13**, 261-91.
- Morgan, D.O. and De Bondt, H.L. (1994) Protein kinase regulation: insights from crystal structure analysis. *Curr Opin Cell Biol*, **6**, 239-46.
- Mottram, J.C. and Grant, K.M. (1996) *Leishmania mexicana* p12cks1, a homologue of fission yeast p13suc1, associates with a stage-regulated histone H1 kinase. *Biochem J*, **316**, 833-9.
- Mudryj, M., Devoto, S.H., Hiebert, S.W., Hunter, T., Pines, J. and Nevins, J.R. (1991) Cell cycle regulation of the E2F transcription factor involves an interaction with cyclin A. *Cell*, **65**, 1243-53.
- Mudryj, M., Hiebert, S.W. and Nevins, J.R. (1990) A role for the adenovirus inducible E2F transcription factor in a proliferation dependent signal transduction pathway. *Embo J*, **9**, 2179-84.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **51**, 263-73.
- Nakanishi, M., Robetorye, R.S., Adami, G.R., Pereira-Smith, O.M. and Smith, J.R. (1995) Identification of the active region of the DNA synthesis inhibitory gene p21Sdi1/CIP1/WAF1. *Embo J*, **14**, 555-63.
- Nevins, J.R. (1992) E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science*, **258**, 424-9.
- Nigg, E.A. (1993) Targets of cyclin-dependent protein kinases. *Curr Opin Cell Biol*, **5**, 187-93.
- Nigg, E.A. (1995) Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays*, **17**, 471-80.
- Noda, A., Ning, Y., Venable, S.F., Pereira-Smith, O.M. and Smith, J.R. (1994) Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res*, **211**, 90-8.
- Norbury, C., Blow, J. and Nurse, P. (1991) Regulatory phosphorylation of the p34cdc2 protein kinase in vertebrates. *Embo J*, **10**, 3321-9.
- Norbury, C. and Nurse, P. (1992) Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem*, **61**, 441-70.

- Ogris, E., Rotheneder, H., Mudrak, I., Pichler, A. and Wintersberger, E. (1993) A binding site for transcription factor E2F is a target for trans activation of murine thymidine kinase by polyomavirus large T antigen and plays an important role in growth regulation of the gene. *J Virol*, **67**, 1765-71.
- Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W. and Draetta, G. (1992) Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *Embo J*, **11**, 961-71.
- Paggi, M.G., Baldi, A., Bonetto, F. and Giordano, A. (1996) Retinoblastoma protein family in cell cycle and cancer: a review. *J Cell Biochem*, **62**, 418-30.
- Pardee, A.B. (1989) G1 events and regulation of cell proliferation. *Science*, **246**, 603-8.
- Paris, J., Le Guellec, R., Couturier, A., Le Guellec, K., Omilli, F., Camonis, J., MacNeill, S. and Philippe, M. (1991) Cloning by differential screening of a *Xenopus* cDNA coding for a protein highly homologous to *cdc2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 1039-43.
- Patra, D. and Dunphy, W.G. (1996) Xe-p9, a *Xenopus* Suc1/Cks homolog, has multiple essential roles in cell cycle control. *Genes Dev*, **10**, 1503-15.
- Patra, D. and Dunphy, W.G. (1998) Xe-p9, a *Xenopus* Suc1/Cks protein, is essential for the Cdc2-dependent phosphorylation of the anaphase-promoting complex at mitosis. *Genes Dev*, **12**, 2549-59.
- Patra, D., Wang, S.X., Kumagai, A. and Dunphy, W.G. (1999) The *xenopus* Suc1/Cks protein promotes the phosphorylation of G(2)/M regulators. *J Biol Chem*, **274**, 36839-42.
- Patton, E.E., Willems, A.R., Sa, D., Kuras, L., Thomas, D., Craig, K.L. and Tyers, M. (1998) Cdc53 is a scaffold protein for multiple Cdc34/Skp1/F-box protein complexes that regulate cell division and methionine biosynthesis in yeast [published erratum appears in *Genes Dev* 1998 Oct 1;12(19):3144]. *Genes Dev*, **12**, 692-705.
- Paz, Y., Elazar, Z. and Fass, D. (2000) Structure of GATE-16, membrane transport modulator and mammalian ortholog of autophagocytosis factor Aut7p. *J Biol Chem*, **275**, 25445-50.
- Pearson, B.E., Nasheuer, H.P. and Wang, T.S. (1991) Human DNA polymerase alpha gene: sequences controlling expression in cycling and serum-stimulated cells. *Mol Cell Biol*, **11**, 2081-95.

- Peeper, D.S., Parker, L.I., Ewen, M.E., Toebes, M., Hall, F.L., Xu, M., Zantema, A., van der Eb, A.J. and Piwnica-Worms, H. (1993) A- and B-type cyclins differentially modulate substrate specificity of cyclin-cdk complexes. *Embo J*, **12**, 1947-54.
- Pines, J. (1994) The cell cycle kinases. *Semin Cancer Biol*, **5**, 305-13.
- Pines, J. (1996) Cell cycle: reaching for a role for the Cks proteins. *Curr Biol*, **6**, 1399-402.
- Pines, J. and Hunter, T. (1990) Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature*, **346**, 760-3.
- Polyak, K., Kato, J.Y., Solomon, M.J., Sherr, C.J., Massague, J., Roberts, J.M. and Koff, A. (1994a) p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev*, **8**, 9-22.
- Polyak, K., Lee, M.H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J.M., Tempst, P. and Massague, J. (1994b) Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell*, **78**, 59-66.
- Poon, R.Y., Yamashita, K., Adamczewski, J.P., Hunt, T. and Shuttleworth, J. (1993) The cdc2-related protein p40MO15 is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33cdk2 and p34cdc2. *Embo J*, **12**, 3123-32.
- Porath, J. (1985) *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*. Walter de Gruyter & Co, Berlin & NY.
- Quelle, D.E., Ashmun, R.A., Shurtleff, S.A., Kato, J.Y., Bar-Sagi, D., Roussel, M.F. and Sherr, C.J. (1993) Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev*, **7**, 1559-71.
- Reed, S.I., Dulic, V., Lew, D.J., Richardson, H.E. and Wittenberg, C. (1992) G1 control in yeast and animal cells. *Ciba Found Symp*, **170**, 7-15; discussion 15-9.
- Resnitzky, D., Hengst, L. and Reed, S.I. (1995) Cyclin A-associated kinase activity is rate limiting for entrance into S phase and is negatively regulated in G1 by p27Kip1. *Mol Cell Biol*, **15**, 4347-52.
- Reynard, G.J., Reynolds, W., Verma, R. and Deshaies, R.J. (2000) Cks1 is required for G(1) cyclin-cyclin-dependent kinase activity in budding yeast.

Mol Cell Biol, **20**, 5858-64.

- Richardson, H.E., Stueland, C.S., Thomas, J., Russell, P. and Reed, S.I. (1990) Human cDNAs encoding homologs of the small p34Cdc28/Cdc2-associated protein of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev*, **4**, 1332-44.
- Rizzuto, R., Brini, M., Pizzo, P., Murgia, M. and Pozzan, T. (1995) Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells. *Curr Biol*, **5**, 635-42.
- Russo, A.A., Jeffrey, P.D., Patten, A.K., Massague, J. and Pavletich, N.P. (1996a) Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature*, **382**, 325-31.
- Russo, A.A., Jeffrey, P.D. and Pavletich, N.P. (1996b) Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat Struct Biol*, **3**, 696-700.
- Sagiv, Y., Legesse-Miller, A., Porat, A. and Elazar, Z. (2000) GATE-16, a membrane transport modulator, interacts with NSF and the Golgi v-SNARE GOS-28. *Embo J*, **19**, 1494-504.
- Saiki, R.K., Bugawan, T.L., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1986) Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*, **324**, 163-6.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-91.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-4.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467.
- Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite, L., Tagle, D.A., Smith, S., Uziel, T., Sfez, S. and et al. (1995) A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science*, **268**, 1749-53.

- Schiestl, R.H. and Gietz, R.D. (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet*, **16**, 339-46.
- Schulman, B.A., Carrano, A.C., Jeffrey, P.D., Bowen, Z., Kinnucan, E.R., Finnin, M.S., Elledge, S.J., Harper, J.W., Pagano, M. and Pavletich, N.P. (2000) Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex. *Nature*, **408**, 381-6.
- Serra-Pages, C., Kedersha, N.L., Fazikas, L., Medley, Q., Debant, A. and Streuli, M. (1995) The LAR transmembrane protein tyrosine phosphatase and a coiled-coil LAR-interacting protein co-localize at focal adhesions. *Embo J*, **14**, 2827-38.
- Serrano, M., Hannon, G.J. and Beach, D. (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4 [see comments]. *Nature*, **366**, 704-7.
- Serrano, M., Lee, H., Chin, L., Cordon-Cardo, C., Beach, D. and DePinho, R.A. (1996) Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell*, **85**, 27-37.
- Seufert, W., Futcher, B. and Jentsch, S. (1995) Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. *Nature*, **373**, 78-81.
- Sheaff, R.J., Groudine, M., Gordon, M., Roberts, J.M. and Clurman, B.E. (1997) Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev*, **11**, 1464-78.
- Sherr, C.J. (1993) Mammalian G1 cyclins. *Cell*, **73**, 1059-65.
- Sherr, C.J. (1994) G1 phase progression: cycling on cue [see comments]. *Cell*, **79**, 551-5.
- Sherr, C.J. (1995) D-type cyclins. *Trends Biochem Sci*, **20**, 187-90.
- Sherr, C.J. (1996) Cancer cell cycles. *Science*, **274**, 1672-7.
- Sherr, C.J. and Roberts, J.M. (1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev*, **9**, 1149-63.
- Shteinberg, M. and Hershko, A. (1999) Role of Suc1 in the activation of the cyclosome by protein kinase Cdk1/cyclin B. *Biochem Biophys Res Commun*, **257**, 12-8.
- Skowyra, D., Craig, K.L., Tyers, M., Elledge, S.J. and Harper, J.W. (1997) F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF

- ubiquitin-ligase complex [see comments]. *Cell*, **91**, 209-19.
- Solomon, M.J., Harper, J.W. and Shuttleworth, J. (1993) CAK, the p34cdc2 activating kinase, contains a protein identical or closely related to p40MO15. *Embo J*, **12**, 3133-42.
- Strauss, M., Lukas, J. and Bartek, J. (1995) Unrestricted cell cycling and cancer. *Nat Med*, **1**, 1245-6.
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, **189**, 113-30.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. and Dubendorff, J.W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol*, **185**, 60-89.
- Sudakin, V., Ganoth, D., Dahan, A., Heller, H., Hershko, J., Luca, F.C., Ruderman, J.V. and Hershko, A. (1995) The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol Biol Cell*, **6**, 185-97.
- Suggs, S.V., Wallace, R.B., Hirose, T., Kawashima, E.H. and Itakura, K. (1981) Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 6613-7.
- Sulkowski, E. (1985) Purification of proteins by IMAC. *Trends Biotechnol.*, 1-7.
- Sutterluty, H., Chatelain, E., Marti, A., Wirbelauer, C., Senften, M., Muller, U. and Krek, W. (1999) p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells. *Nat Cell Biol*, **1**, 207-14.
- Tassan, J.P., Schultz, S.J., Bartek, J. and Nigg, E.A. (1994) Cell cycle analysis of the activity, subcellular localization, and subunit composition of human CAK (CDK-activating kinase). *J Cell Biol*, **127**, 467-78.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4.
- Toyoshima, H. and Hunter, T. (1994) p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell*, **78**, 67-74.
- Tsai, A.Y.M., Itoh, M., Streuli, M. and Saito, H. (1991a) Isolation and

- characterization of temperature-sensitive and thermostable mutants of the human receptor-like protein tyrosine phosphatase LAR. *J. Biol. chem.*, **266**, 10534-10543.
- Tsai, L.H., Harlow, E. and Meyerson, M. (1991b) Isolation of the human cdk2 gene that encodes the cyclin A- and adenovirus E1A-associated p33 kinase. *Nature*, **353**, 174-7.
- Tsvetkov, L.M., Yeh, K.H., Lee, S.J., Sun, H. and Zhang, H. (1999) p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Curr Biol*, **9**, 661-4.
- Uzman, B.G., Foley, G.E., Farber, S. and Lazarus, H. (1966) Morphologic variations in human leukemic lymphoblasts (CCRF-CEM cells) after long-term culture and exposure to chemotherapeutic agents. A study with the electron microscope. *Cancer*, **19**, 1725-42.
- Vairo, G., Livingston, D.M. and Ginsberg, D. (1995) Functional interaction between E2F-4 and p130: evidence for distinct mechanisms underlying growth suppression by different retinoblastoma protein family members. *Genes Dev*, **9**, 869-81.
- Vigorito, E. (1999) Papel de la p53 en la apoptosis y en la proliferación de los linfocitos T. *Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica*. Universitat de Barcelona, Barcelona, p. 139.
- Vojtek, A.B., Hollenberg, S.M. and Cooper, J.A. (1993) Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell*, **74**, 205-14.
- Wallace, R.B., Shaffer, J., Murphy, R.F., Bonner, J., Hirose, T. and Itakura, K. (1979) Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res*, **6**, 3543-57.
- Wang, S. and Hazelrigg, T. (1994) Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature*, **369**, 400-03.
- Wang, T.C., Cardiff, R.D., Zukerberg, L., Lees, E., Arnold, A. and Schmidt, E.V. (1994) Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice. *Nature*, **369**, 669-71.
- Warbrick, E., Lane, D.P., Glover, D.M. and Cox, L.S. (1995) A small peptide inhibitor of DNA replication defines the site of interaction between the cyclin-

- dependent kinase inhibitor p21WAF1 and proliferating cell nuclear antigen. *Curr Biol*, **5**, 275-82.
- Weber, J.D., Raben, D.M., Phillips, P.J. and Baldassare, J.J. (1997) Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase. *Biochem J*, **326**, 61-8.
- Weinberg, R.A. (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, **81**, 323-30.
- Weintraub, H. (1993) The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell*, **75**, 1241-4.
- Weiss, A., Wiskocil, R.L. and Stobo, J.D. (1984) The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level. *J Immunol*, **133**, 123-8.
- Whyte, P. (1995) The retinoblastoma protein and its relatives. *Semin Cancer Biol*, **6**, 83-90.
- Winston, J.T., Coats, S.R., Wang, Y.Z. and Pledger, W.J. (1996) Regulation of the cell cycle machinery by oncogenic ras. *Oncogene*, **12**, 127-34.
- Winston, J.T., Koepf, D.M., Zhu, C., Elledge, S.J. and Harper, J.W. (1999) A family of mammalian F-box proteins. *Curr Biol*, **9**, 1180-2.
- Wirbelauer, C., Sutterluty, H., Blondel, M., Gstaiger, M., Peter, M., Reymond, F. and Krek, W. (2000) The F-box protein Skp2 is a ubiquitylation target of a Cul1-based core ubiquitin ligase complex: evidence for a role of Cul1 in the suppression of Skp2 expression in quiescent fibroblasts. *Embo J*, **19**, 5362-5375.
- Won, K.A. and Reed, S.I. (1996) Activation of cyclin E/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *Embo J*, **15**, 4182-93.
- Xiao, Q., Claassen, G., Shi, J., Adachi, S., Sedivy, J. and Hann, S.R. (1998) Transactivation-defective c-MycS retains the ability to regulate proliferation and apoptosis. *Genes Dev*, **12**, 3803-8.
- Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. and Beach, D. (1993a) p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases [see comments]. *Nature*, **366**, 701-4.

- Xiong, Y., Zhang, H. and Beach, D. (1993b) Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation. *Genes Dev*, **7**, 1572-83.
- Yaglom, J., Linskens, M.H., Sadis, S., Rubin, D.M., Futcher, B. and Finley, D. (1995) p34Cdc28-mediated control of Cln3 cyclin degradation. *Mol Cell Biol*, **15**, 731-41.
- Yam, C.H., Ng, R.W., Siu, W.Y., Lau, A.W. and Poon, R.Y. (1999) Regulation of cyclin A-Cdk2 by SCF component Skp1 and F-box protein Skp2. *Mol Cell Biol*, **19**, 635-45.
- Yeh, K.H., Kondo, T., Zheng, J., Tsvetkov, L.M., Blair, J. and Zhang, H. (2001) The F-Box Protein SKP2 Binds to the Phosphorylated Threonine 380 in Cyclin E and Regulates Ubiquitin-Dependent Degradation of Cyclin E. *Biochem Biophys Res Commun*, **281**, 884-890.
- Yocum, R.R., Hanley, S., West, R., Jr. and Ptashne, M. (1984) Use of lacZ fusions to delimit regulatory elements of the inducible divergent GAL1-GAL10 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **4**, 1985-98.
- Yu, Z.K., Gervais, J.L. and Zhang, H. (1998) Human CUL-1 associates with the SKP1/SKP2 complex and regulates p21(CIP1/WAF1) and cyclin D proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 11324-9.
- Zhan, Q., Carrier, F. and Fornace, A.J., Jr. (1993) Induction of cellular p53 activity by DNA-damaging agents and growth arrest [published erratum appears in *Mol Cell Biol* 1993 Sep;13(9):5928]. *Mol Cell Biol*, **13**, 4242-50.
- Zhang, H., Kobayashi, R., Galaktionov, K. and Beach, D. (1995) p19Skp1 and p45Skp2 are essential elements of the cyclin A-CDK2 S phase kinase. *Cell*, **82**, 915-25.
- Zhang, H., Xiong, Y. and Beach, D. (1993) Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Mol Biol Cell*, **4**, 897-906.
- Zhao, Y., Sulkowski, E. and Porath, J. (1991) Surface topography of histidine residues in lysozymes. *Eur J Biochem*, 1115-1119.
- Zindy, F., Lamas, E., Chenivesse, X., Sobczak, J., Wang, J., Fesquet, D., Henglein, B. and Brechot, C. (1992) Cyclin A is required in S phase in normal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **182**, 1144-54.

VIII. PUBLICACIONS

Mongay, L., Plaza, S., Vigorito, E., Serra-Pagès, C., Vives, J. (2001) Association of the cell cycle-regulatory proteins p45^{SKP2} and CksHs1. Functional effect on CDK2 complex formation and kinase activity. *J Biol Chem*, (*in press*).

Vigorito, E., Plaza, S., Mir, L., **Mongay, L.**, Vinas, O., Serra-Pages, C. and Vives, J. (1999) Contributions of p53 and PMA to gamma-irradiation induced apoptosis in Jurkat cells. *Hematol Cell Ther*, 41, 153-61.

Palou, E., **Mongay, L.**, Arias, M.T., Isart, F., Suarez, B., Masso, M., Fabregat, V., Martorell, J. and Gaya, A. (1999) Identification of a novel DRB1-allele (DRB1*0106) by sequence-based typing. *Tissue Antigens*, 53, 308-10.

