

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**“CONEXIÓN FUNCIONAL ENTRE LOS SUPRESORES DE
TUMORES ARF Y p33ING1”**

LARA GONZÁLEZ GÓMEZ

MADRID 2007

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**“CONEXIONES FUNCIONALES ENTRE LOS SUPRESORES DE
TUMORES ARF Y p33ING1”**

LARA GONZÁLEZ GÓMEZ
Licenciada en Ciencias Biológicas

Director de tesis: Dr. Ignacio Palmero Rodríguez

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”
C.S.I.C.- U.A.M.

AGRADECIMIENTOS

A quien ha hecho posible que pudiera realizar este trabajo, el Dr. Ignacio Palmero Rodríguez. Gracias por su paciencia y buen hacer como instructor y por la confianza depositada al poner este proyecto en mis manos.

A mis compañeros de laboratorio, que para mí son tanto los del 1.4.1. como los del 1.4.2. A todos por escucharme y aguantar rabietas y lloros durante todo este tiempo, pero también os habéis reído mucho conmigo ¿eh?. A María por tantos años dentro y fuera del labo, por ser amiga, compañera y confidente. A Leti por su sinceridad y esos cigarros compartidos que tanto necesito a veces, y me lo nota, esos ratos han sido cruciales. A Esther por su cariño anónimo, sus manualidades y su madurez. A Camino por su cariño y porque siempre se acuerda de todo, gracias por tu interés. A Bárbara por las charlas, las de ciencia y las de cualquier otra cosa, pero sobre todo por las segundas, que son las que más falta hacen en este ámbito. A las chicas que han dejado en el labo sus risas, Julieta y Natacha, y ese “toquesito argentino”. A los chicos que rompieron el escuadrón de las Palmero’s Angels, Dani y Alberto, gracias por intentar comprenderme sin conocerme, y haberme comprendido finalmente. A Gema, que ha sido como del 1.4. y con la que creo que tengo tantas cosas en común. A Gloria, por decidir hacer su vida en España con nosotros, ¡ah! ¡y por ese increíble chocolate negro suizo!. A la Dra. Carmela Calés, por su cariño y su trato casi maternal a veces, sobre todo cuando más falta me hacía. A Iván, a Pilar... a todos los que habéis pasado por el 1.4., todos habéis aportado algo en esta etapa.

A los compis de otros labos, 0.3. , 2.4.1. , 2.4.2. , 2.7. , a los desaparecidos del 1.8. ... por las fiestas de navidad, carnaval, y alguna cañita de vez en cuando, además gracias por la ayuda cada vez que he necesitado que me enseñárais algo.

A Javi Merino, Nani, Gonzalo, Guti, Ricardo, Antonio y Javi, por estar siempre que se les necesita, ¡sobre todo en las emergencias!. A todos muchas gracias y un besazo enorme, ¡ah! ¡Gonzalo! en cuanto lea nos tomamos todas las cañas atrasadas con abrazo incluido.

A el equipo de guardias de seguridad que velan por el instituto, sobre todo los fines de semana, y en especial al más antiguo, Carlos, que nos ha dado un susto, pero ya podemos decir de nuevo aquello de : “¡cómo lo pasemos en el iib!”.

A los que fueron mis compañeros en la clínica Puerta de Hierro, y me iniciaron en este camino de la ciencia, Javi, Juan, Carlos y Víctor, todos doctores, pero sobre todo, amigos. Por supuesto al Dr. Ricardo Sánchez Prieto y al Dr. Santiago Ramón y Cajal por la oportunidad de aprender que me brindaron en su día.

A mis amigos de la facultad, que están casi todos relacionados con la ciencia, parece que nos picó el mismo insecto a todos. A Mónica, porque hemos estado muy unidas y espero que trabajar juntas no lo estropee. Le dedico este trabajo especialmente ya que no va a estar en la presentación, y la voy a echar mucho de menos. A Ángel por demostrar cariño y apoyo de esa forma tan diferente y sorprenderme cada día. A Silvia, que aunque esté lejos siempre está. A Pablo Piercing por enseñarme esa otra forma de ver la vida. A Pablo Mancheño, por soplar las brasa para que no se apaguen entr los amigos, y por esas visitas que tanta ilusión hacen con cafelito de máquina incluido. A Vicente, por las risas y no dejar de comer con nosotros los jueves. A Mentxu, por estar ahí a pesar de los inventarios. A Anita, a Guada, a Pumu (Irene), a Alfredo, a Jortxi... a todos, perdonad si no os nombro a todos (respectivos/as incluidos).

A mis amigos de Alcobendas, porque han sido una importante etapa de mi vida, y lo mejor, siguen siendo igual de importantes que cuando vivía cerca de ellos. A Estrella, María, Ana, Elena, Hugo, Fer, Miguel, Bea... porque nunca me han faltado, y espero que nunca me falten. ¡Nos vemos en las bodas!

A mis nuevos amigos en Madrid: Guillermo, Luis, Ana, Rosa, Javi, María... por su increíble acogida, cariño y apoyo.

A mis amigos de Segovia, a los que he tenido tan abandonados, y me temo que no tiene mucho remedio, porque de momento no tengo intención de volver. Aunque mi día a día esté aquí, muchos años de mi vida están allí. A Nuri, Nuri (Luna), Denia, Cris,

Negro, Silvia, Ricardo, Tere, Mónica, Bea, Emiliano... vuelvo a dejarme gente, pero es inevitable.

A Paloma, porque es de las que no fallan nunca, y sé que siempre tengo en ella a mi amiga, compañera de juergas y psicóloga si me hace falta.

A Amelia, porque no se me puede olvidar ya que vivo con ella, y es la que me ayuda a desconectar cuando por fin llegamos a casita. Gracias por hacerme la convivencia tan fácil, amiga.

Y por si no me hubiera emocionado ya...

A mis padres, Raúl e Inmaculada, por TODO, porque si intentase enumerar las razones de mi gratitud no acabaría nunca. Os quiero mucho aunque os lo diga poco.

A mi hermano Jaime, porque esta tesis tiene parte de culpa en que me haya perdido su transición de la pubertad a la adolescencia, este trabajo también es para ti, porque te quiero mucho “pequeñín”.

A mis abuelos, a los que están y a la que no está.

A Carlos, porque no sé que habría sido de mí sin ti en esta etapa de escritura de la tesis, pero es que ya no puedo prescindir de tí en el resto de etapas de mi vida, TE QUIERO.

RESUMEN/ABSTRACT

Las proteínas ARF y p33ING1 son supresores tumorales relacionados con la vía de p53. ARF (uno de los productos del locus INK4a/ARF), juega un papel crítico en la activación de p53 en respuesta a estrés oncogénico. El mecanismo mejor caracterizado de actuación de ARF es inhibir la acción de Mdm2, proteína que es capaz de degradar p53 por la vía del proteasoma. p33ING1 miembro de la familia de proteínas ING (*Inhibitor of Growth*), está conectado con la vía de p53 y con la maquinaria de remodelación de cromatina, y está implicada en regulación del ciclo celular y apoptosis p53 dependiente. En este trabajo hemos investigado la posible existencia de conexiones funcionales entre ambas proteínas en el contexto de respuestas de protección antitumoral mediadas por p53. Hemos comprobado que ARF y p33ING1 pueden estar asociadas *in vivo*. También mostramos que la localización subcelular de p33ING1 puede ser modulada por ARF, favoreciendo su acumulación en nucleolo. Esta conexión tiene repercusión a nivel funcional. La capacidad de p33ING1 de producir parada del ciclo, y la inducción de genes diana de p53 como p21CIP1 y Mdm2, requiere la presencia de ARF funcional. ARF es dispensable para la capacidad de p33ING1 de acumular la proteína p53 en fibroblastos primarios, aunque este efecto podría ser dependiente de contexto.

Nuestras observaciones identifican una nueva conexión funcional entre dos supresores tumorales ligados a p53. De este modo, contribuyen a avanzar en el conocimiento del mecanismo de actuación de ambas proteínas en protección antitumoral y revelan nuevos niveles de regulación de la vía de supresión tumoral controlada por p53.

The ARF and p33ING1 tumour suppressor proteins are related to the p53 pathway. The ARF protein (one of the products of INK4a/ARF locus), plays a critical role in p53 activation in response to oncogenic stress. The best known mechanism of ARF is the inhibition of Mdm2 action, which ubiquitinates and degrades p53 via the proteasome pathway. p33ING1, member of the ING (*Inhibitor of Growth*) family of proteins, is connected with the p53 pathway and with the chromatin modification machinery, and is also implicated in p53-dependent cell cycle regulation and apoptosis. We have investigated the existence of possible functional connections between both proteins in the context of antitumoural protection responses mediated by p53. We have obtained evidence of the association of ARF and p33ING1 *in vivo*. We also show that p33ING1 subcellular localization can be modulated by ARF, favouring its accumulation in nucleolus. The ability of p33ING1 to cause cell cycle arrest, apoptosis, and inducing p53 targets like p21CIP1 and Mdm2 is impaired in the ARF-null MEFs. We have also observed that ARF is dispensable for p33ING1-dependent p53 accumulation in primary fibroblasts, although this effect could be context dependent.

Our observations identify a new functional connection between two tumour suppressor proteins linked to p53. These findings contribute to improve the Knowledge of the action of these proteins in antitumoural protection and reveal new regulation levels of the p53 pathway.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
RESUMEN/ABSTRACT	1
ÍNDICE	3
1. ABREVIATURAS	5
2. INTRODUCCIÓN	
1. LA VÍA DE p53 EN SUPRESIÓN TUMORAL	6
1. 1. p53	6
2. EL LOCUS INK4a/ARF	8
2. 1. La proteína ARF	9
2. 1. 1. Estructura y localización de la proteína	9
2. 1. 2. Funciones Biológicas de ARF	10
2. 1. 3. Regulación de ARF:	14
3. LA FAMILIA DE PROTEÍNAS ING.	16
3. 1. ING1	17
3. 1. 1. Estructura y Localización	17
3. 1. 2. Funciones Biológicas de p33ING1.	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4. OBJETIVOS	28
5. RESULTADOS	
1. INTERACCIÓN FÍSICA ENTRE p33ING1 Y p14ARF.	29
1. 1. Dominios de p33ING1 implicados en la interacción.	31
2. EFECTOS DE LA INTERACCIÓN EN LOCALIZACIÓN SUBCELULAR	32
2. 1. p14ARF favorece la acumulación de p33ING1 en el nucleolo.	32
2. 2. Efectos en la localización subcelular de los dominios de p33ING1	36
3. ESTUDIO FUNCIONAL DE LA INTERACCIÓN	37

3. 1. Requerimiento de p19ARF para la parada del ciclo inducida por p33ING1.	39
3. 2. Efecto sobre genes diana de p53.	40
3. 3. Efectos de los mutantes de delección de p33ING1.	42
4. ANÁLISIS DE LA LÍNEA CELULAR EMG CON EXPRESIÓN INDUCIBLE DE p33ING1 Y p14ARF.	43
4. 1. Generación de la línea inducible EMG.	43
4. 2. Análisis de proliferación en la línea celular EMG.	46
4. 3. Efectos en estabilidad.	51
4. 4. Análisis de la estabilidad de p53.	52
6. DISCUSIÓN	54
7. CONCLUSIONES	62
8. BIBLIOGRAFÍA	63
9. ANEXO	

1. ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARF: Pauta de lectura alternativa (*Alternative Reading Frame*)

ING: Inhibidor de crecimiento (*Inhibitor of Growth*)

ARN: Ácido ribonucleico

ARF-BP1: Proteína de unión a ARF, 1 (*ARF Binding Protein 1*)

NPM: Nucleofosmina (*Nucleophosmine*)

smARF: ARF corto mitochondrial (*short mitochondrial ARF*)

HDACs: Histona deacetilasas

HATs: Histona acetil-transferasas

PHD: *Plant Homeo Domain*

NCR: Región conservada (*Novel Conserved Region*)

PIP: Dominio de interacción con PCNA (*PCNA Interacting Protein Motif*)

PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular

UV: Ultravioleta

BrdU: Bromodesoxiuridina

NLS: Secuencia de localización nuclear

MEFs: Fibroblastos embrionarios de ratón

wt: salvaje (Wild type)

PI: Ioduro de Propidio

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's modified Eagle médium)

FCS: Suero fetal de cordero (Fetal calf serum)

mARN: ARN mensajero

CDKs: Quinasas dependientes de ciclinas

PBS: Tampón fosfato salino (Phosphate Buffered Saline)

2. INTRODUCCIÓN

1. LA VÍA DE p53 EN SUPRESIÓN TUMORAL

Los organismos superiores se encuentran expuestos a diversos estímulos potencialmente oncogénicos, y poseen mecanismos naturales a nivel celular para protegerse frente a ellos. Estos estímulos pueden ser ambientales, o pueden producirse en el interior de las células. Los procesos naturales de protección frente a estos estímulos, se llaman mecanismos de supresión tumoral o protección antitumoral, y evitan el desarrollo del cáncer actuando a distintos niveles.

Estos mecanismos son llevados a cabo por genes supresores de tumores, una clase de genes que controlan el crecimiento celular con función opuesta a los oncogenes los oncogenes. Estos genes funcionan suprimiendo la proliferación de células potencialmente tumorales. Cuando estos genes están ausentes o se encuentran inactivados, se favorece la formación de tumores.

Uno de los supresores de tumores más conocido y mejor caracterizado es p53, que se encuentra mutado o inactivado en la gran mayoría de los tumores humanos (Vousden and Lane, 2007).

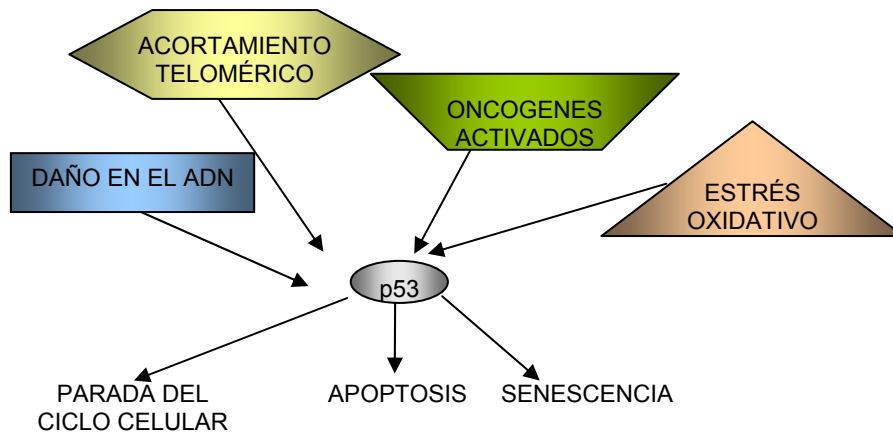


Fig. 1 .Principales estímulos y respuestas biológicas de la vía de p53.

1. 1. p53

La funcionalidad de la vía de p53 está afectada en prácticamente la totalidad de los tumores conocidos por mutación en p53, o por alteraciones en otros efectores o reguladores de la vía. p53 desempeña un papel crítico en la respuesta celular a estímulos

potencialmente oncogénicos activando respuestas que impide el crecimiento descontrolado de células dañadas, impidiendo su transformación maligna (Vogelstein et al., 2000; Vousden and Lane, 2007).

El gen supresor de tumores p53 se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17, en la banda 13. La proteína p53 es un factor de transcripción que regula una batería de genes implicados en el control de la progresión del ciclo celular, integridad del ADN, apoptosis y senescencia.

p53 se activa en las células a causa de múltiples tipos de señales, como pueden ser varios tipos de estrés que provocan daño en el ADN, hipoxia, acortamiento telomérico y estímulos mitogénicos excesivos. La regulación de p53 se ejerce, principalmente, controlando los niveles de la proteína. El principal regulador de la estabilidad de p53 es Mdm2, a su vez un gen diana de p53, que favorece su ubiquitinación y degradación por la vía del proteasoma (Brooks and Gu, 2006). p53 forma con Mdm2 un ciclo de retroalimentación autoregulatoria. La proteína p53 también sufre modificaciones post-traduccionales como fosforilación y acetilación entre otras, que contribuyen a su actividad. p53 se acumula activando distintos tipos de respuestas en función de una serie de factores como la intensidad del daño, el tipo celular o el tipo de estímulo. Por ejemplo, si el ADN está dañado, el gen p53 se acumula parando la replicación para proporcionar más tiempo a las células para su reparación. Las células en las que p53 está inactivado no pueden llevar a cabo esa parada en el ciclo celular. Son por lo tanto genéticamente inestables y acumularán mutaciones y reorganizaciones cromosómicas. Si falla la reparación o el daño es excesivo, p53 puede desencadenar la parada del ciclo celular de forma transitoria para reparar el daño, o bien de forma permanente induciendo senescencia, mediante transactivación de genes como p21CIP1 o GADD45 (Vousden and Lane, 2007). p53 también puede disparar la apoptosis (muerte celular programada) de la célula mediante la transactivación de un serie de genes diana, dentro de los que se incluyen miembros de la familia de los pro-apoptóticos Bcl2, como *puma*, *noxa*, *bid* y *bax*, así como algunos componentes de la señalización por receptores de estrés por muerte celular, como DR5 o Fas/CD95, la maquinaria efectora de apoptosis: caspasa-6, Apaf-1 y PIDD, e incluso es capaz de activar directamente la liberación del citocromo c. (Lowe et al., 2004).

Un proceso en el que p53 ejerce una función crítica es en la senescencia celular, proceso por el cual tras la activación de una serie de genes, la célula llega a un

estado estable de parada del ciclo celular. La senescencia está considerada un mecanismo de supresión tumoral que se activa en células que sufren estímulos potencialmente oncogénicos como disfunción telomérica, estrés genotóxico, hipoxia, o activación de oncogenes impidiendo la proliferación y la formación de tumores (Braig et al., 2005; Campisi, 2001; Campisi, 2005; Hemann and Narita, 2007; Lowe et al., 2004).

2. EL LOCUS INK4a/ARF

El locus INK4a/ARF se identificó inicialmente como un posible supresor tumoral debido a estudios genéticos que mostraban que la predisposición a aparición de melanomas en algunas familias estaba asociada a alteraciones en la región 21 del brazo corto del cromosoma 9 en humanos. Posteriormente se ha comprobado que el locus INK4a/ARF está alterado en un alto número de tipos tumorales. Las alteraciones del locus se suelen dar por delección, metilación o mutación puntual dentro del locus (Ruas and Peters, 1998; Sharpless, 2005).

El locus INK4a/ARF codifica por una parte, la proteína p16INK4a, inhibidora de las quinasas dependientes de ciclinas 4 y 6, que controlan la fase G1 del ciclo celular y considerada un supresor tumoral porque se encuentra mutado en gran número de tumores. Adyacente a p16INK4a, se encuentra el gen p15INK4b, cuyas funciones bioquímicas son indistinguibles de las de p16INK4a. Actualmente existe una tendencia a incluir p15INK4b y p16INK4a en un único locus, llamándole INK4a/ARF/INK4b (Gallagher et al., 2006; Gil and Peters, 2006; Kim, 2006; Sherr and Weber, 2000).

Por otro lado, el locus codifica para la proteína ARF (*Alternative Reading Frame*), denominada p14ARF en humanos y p19ARF en ratón, con traducción en una pauta de lectura alternativa a p16INK4a. Comparte con p16INK4a el segundo y tercer exones pero difieren en el primer exón, p16INK4a el 1 α y p14/p19ARF el 1 β . ARF también es un supresor tumoral conectado con la vía de p53 (Fig. 2) (Gallagher et al., 2006; Gil and Peters, 2006; Kim, 2006; Sherr and Weber, 2000).

Se cree que p16INK4a apareció por duplicación en tándem de p15INKb. El exón 1 β se intercaló en algún momento de la evolución entre los genes INK4a e INK4b, y resultó producir una proteína con estructura y funciones bioquímicas completamente

diferentes a las otras codificadas en el locus. Sin embargo ARF comparte señales regulatorias con p16 y además los exones 2 y 3 le confieren estabilidad a la proteína ARF. El diseño del locus se encuentra altamente conservado en mamíferos. En aves sin embargo el procesamiento del ARNm de ARF no incluye el exón 2, de modo que el sólo el exón 1 β codifica la proteína, más pequeña pero funcional p7ARF (Gil and Peters, 2006; Sherr, 2006).

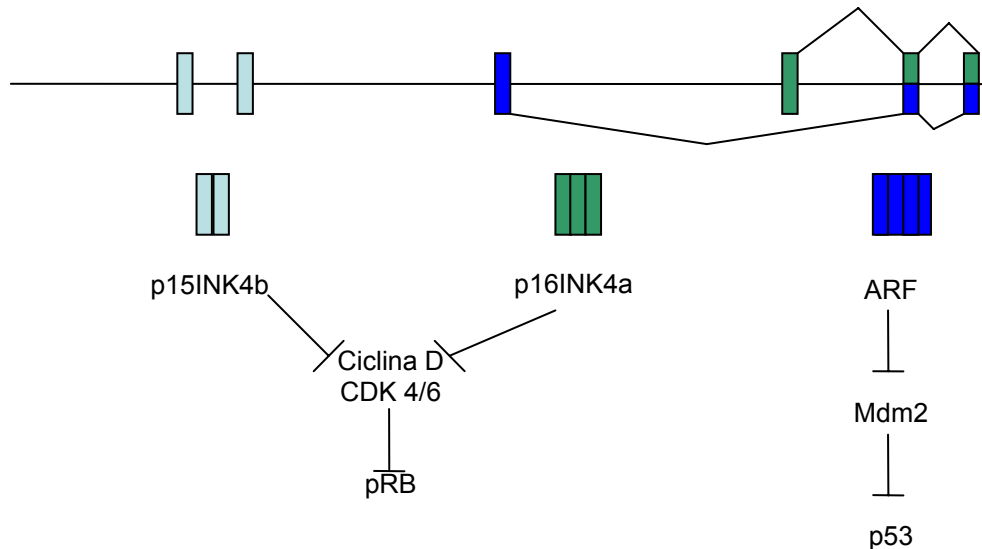


Fig. 2. Estructura del locus INK4a/ARF/INK4b.

2. 1. La proteína ARF

2. 1. 1. Estructura y localización de la proteína

Las proteínas ARF que nos ocupan en este trabajo, p14ARF (humana) con 132 aminoácidos y peso molecular de 13,9 kD y p19ARF (ratón) con 169 aminoácidos y 19,2 kD, están compuestas de más de un 20% de residuos básicos (mayoritariamente arginina) bastante repartidos por la molécula. Esto confiere un carácter muy básico a las proteínas y como consecuencia el hecho de que, sin asociarse con otras proteínas, probablemente se encuentren desestructuradas.

La localización de ARF es predominantemente nucleolar, aunque existe también una fracción nucleoplasmática (Clark et al., 2002; Gallagher et al., 2006; Llanos et al., 2001; Sherr, 2006). La mayor homología entre p14ARF (humano) y p19ARF (ratón) se encuentra en la región amino-terminal codificada en el exón 1 β , un total de 14 aminoácidos. En esta región se encuentra la principal secuencia de localización

nucleolar de ARF humano y de ratón, la de unión a Mdm2 y la secuencia que le confiere la capacidad de provocar parada en el ciclo celular. En el caso de p14ARF, su extremo carboxi-terminal contiene la región implicada en sumoilación de sus proteínas asociadas y una secuencia de localización nucleolar adicional (Gallagher et al., 2006; Sherr, 2006).

2. 1. 2. Funciones Biológicas de ARF

La proteína ARF es un activador directo de p53 cuando se encuentra sobreexpresado por señales de estrés (Lowe and Sherr, 2003; Sherr, 2001a). La función de ARF mejor descrita es la estabilización de la proteína p53, inhibiendo la acción de la proteína Mdm2 como ubiquitín-ligasa E3 que degrada a p53 por la vía del proteasoma, (Kamijo et al., 1998; Pomerantz et al., 1998; Stott et al., 1998; Zhang et al., 1998) (Fig. 3). Mdm2 no es la única ubiquitín ligasa a la que se une ARF, también a otra de tipo E3 llamada ARF-BP1/Mule (ARF binding protein 1/Mcl Ubiquitín Ligasa E3), que también degrada p53, uniéndose a éste y ubiquitinándole de forma independiente de Mdm2 (Chen et al., 2005; Zhong et al., 2005).

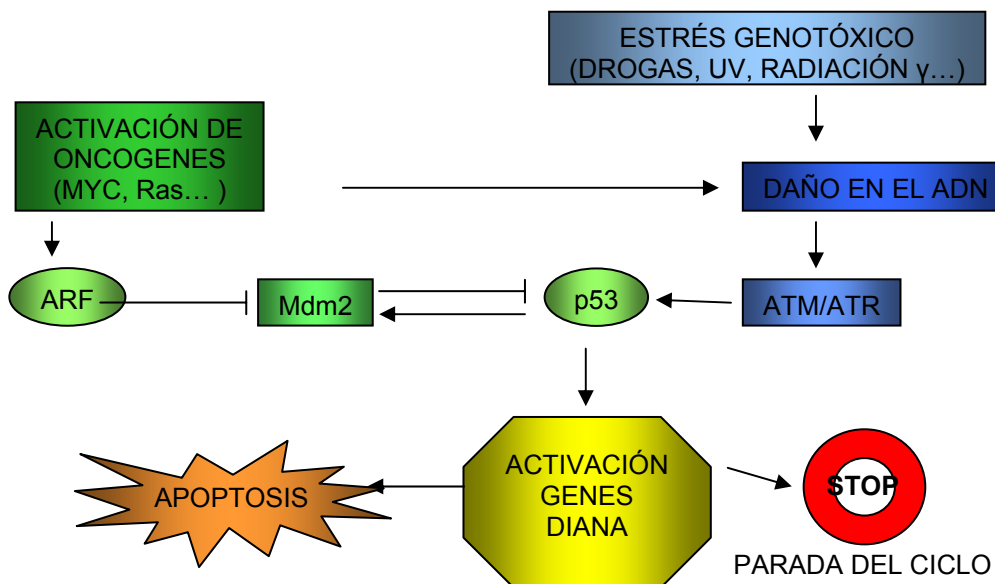


Fig. 3. Esquema básico de la activación de ARF y su repercusión en la vía de p53.

ARF favorece el secuestro de Mdm2 en el nucleolo. Sin embargo, la relocalización al nucleolo de Mdm2 no es indispensable para la activación de p53 por ARF. ARF podría actuar también en el nucleoplasma, facilitando la inhibición directa de la acción de Mdm2 sobre p53 (Gjerset, 2006a; Gjerset, 2006b; Korgaonkar et al., 2005; Llanos et al., 2001). ARF también aumenta la función de p53 de forma indirecta promoviendo fosforilación e inhibiendo la actividad transcripcional de la subunidad RelA de NF-Kb, factor de transcripción que antagoniza la vía de p53 a través de la inducción de Mdm2 y la represión de p53 (Rocha et al., 2003).

Se ha descrito la interacción de ARF con una gran variedad de proteínas, ejerciendo así funciones distintas en la célula, algunas de éstas proteínas y funciones de ARF en interacción con ellas se muestran en la Tabla 1.

PROTEÍNA	FUNCIÓN DE ARF
ARF-BP1/Mule	Inhibe la actividad de la ubiquitina ligasa ARF-BP1 (Chen et al., 2005; Zhong et al., 2005).
ATM y ATR	La pérdida de ARF puede atenuar esta ruta de respuesta a daño a ADN (Rocha et al., 2003).
BCL6	Inhibición de la actividad transcripcional de BCL6 (Suzuki and Wei, 2005).
DP-1	Inhibe formación del complejo transcripcional activo E2F1-DP1(Datta et al., 2002).
CARF	ARF aumenta su capacidad de parar el ciclo celular (Hasan et al., 2002).
DP-1	Inhibe formación del complejo transcripcional activo E2F1-DP1(Datta et al., 2002).
E2Fs	Favorece degradación de E2F1, 2 y 3 (Eymin et al., 2001; Martelli et al., 2001).
FOXM1B	Inhibe la transactivación de FOXM1B (Kalinichenko et al., 2004).
HIF-1 α	Inhibe la transactivación de HIF-1 α (Fatyol and Szalay, 2001).
Mdm2	Inhibe su acción ubiquitina-ligasa sobre p53 (Pomerantz et al., 1998).
MYC	Inhibe la transactivación de MYC (Datta et al., 2004)

Nucleofosmina/B23	B23 estabiliza ARF y regula la biogénesis de ribosomas en colaboración con B23 (Bertwistle et al., 2004; Itahana et al., 2003; Sharpless, 2005).
Tip60	En interacción con esta histona acetil-transferasa activa la ruta de señalización ATM/ATR/CHK y es capaz de acumular Rb (Eymen et al., 2006; Leduc et al., 2006)
YY1	Al interactuar con este factor de transcripción compromete la ubiquitinación de p53 vía YY1-Mdm2-p53 (Sui et al., 2004)

Tabla 1. Proteínas que interactúan con ARF. En la tabla se reflejan las proteínas en la columna de la izquierda y la función de ARF en colaboración con ellas en la columna de la derecha.

Aunque la estabilización de p53 vía Mdm2 es la función mejor caracterizada de ARF, se han descrito funciones de ARF independientes de p53 que en muchos casos implican interacción con proteínas distintas a Mdm2. Uno de los ejemplos mejor caracterizados es la interacción con B23, también llamada Nucleofosmina (NPM) o NO38. La interacción con B23 es muy importante para la estabilidad y localización de ARF. En condiciones normales, ARF se haya unido a B23 en el nucleolo y su vida media es de 6 a 8 horas. Si los niveles de B23 aumentan, se incrementa la estabilidad de ARF. Cuando B23 es inactivado, ARF es excluido del nucleolo y desestabilizado (Colombo, 2005). Esta estabilización de ARF es independiente de p53. Se ha visto también que mutantes de ARF que no unen B23 son degradados más rápidamente por poliubiquitinación por la vía del proteasoma (Kuo et al., 2004).

Se ha sugerido también que ARF en asociación con B23, regula la biogénesis de ribosomas, retardando el procesamiento y transporte al citoplasma de los ARN ribosómicos precursores tempranos 47S/45S y 32S. Ésta función de ARF asociada a B23 sería independiente de p53 (Sharpless, 2005).

Otra de las funciones biológicas de ARF independientes de p53 es favorecer la sumoilación de sus moléculas asociadas. La sumoilación es una modificación post-traducciona análoga a la ubiquitinación, sin embargo, el significado funcional de la sumoilación favorecida por ARF de algunas de sus proteínas interaccionantes como Mdm2 o B23 sigue siendo una incógnita (Gallagher et al., 2006; Rizos et al., 2005; Sherr, 2006).

Existen evidencias de la existencia de formas cortas de la proteína ARF llamadas smARF (*short mitochondrial ARF*), producidas por iniciación en metioninas internas de transcritos de ARF humano y de ratón que se localizan en las mitocondrias. Su sobreexpresión altera el potencial de la membrana mitocondrial, disparando procesos de autofagia, que actuarían como mecanismos de supresión tumoral p53-independientes (Reef, 2006; Sherr, 2006).

Por otro lado, hay evidencias genéticas que identificarían a ARF como supresor tumoral, independientemente de p53. Los animales ARF deficientes con p16INK4a funcional presentan alta predisposición general a formar tumores, lo que demuestra que ARF es el principal responsable de la función de supresión tumoral del locus INK4a/ARF en ratones (Kamijo et al., 1997). Animales doble o triplemente deficientes para ARF/p53 o ARF/p53/Mdm2, experimentan la aparición de tumores primarios de diferentes tipos a los que desarrollan los ARF deficientes o p53 deficientes. Éstas observaciones sugieren una función supresora tumoral de ARF independiente de p53 y Mdm2 (Weber et al., 2000). También se ha visto actuación de ARF independiente de p53 en un modelo de carcinogénesis en piel. En este modelo se observó que la aparición de los papilomas estaba acelerada en animales p19ARF deficientes en comparación con los ratones de genotipo salvaje, mientras que estaba retrasada en los p53 deficientes (Kelly-Spratt et al., 2004).

ARF también tiene efectos en transcripción, inhibiendo la transactivación mediada por proteínas como HIF-1 α , MYC y FOXM1B cuando interacciona con ellas (Datta et al., 2004; Fatyol and Szalay, 2001), así como inhibiendo la represión transcripcional que ejerce otra proteína con la que interacciona, BCL6 (Suzuki and Wei, 2005) o evitando la formación de complejos transcripcionalmente activos como E2F1-DP1 (Datta et al., 2002). Tip60 también forma parte del complejo co-activador de la transcripción de MYC, y ARF es capaz de interactuar con este complejo por unión al mismo dominio por el que se une Tip60, de modo que ARF inhibe la acetilación de dianas de Tip60 (Eymin et al., 2006; Leduc et al., 2006). La conexión de ARF con Tip60 también activa vías de señalización como la de respuesta a daño a ADN mediada por ATM/ATR/CHK uniéndose ARF a la histona acetil-transferasa Tip60 y estabilizándola de forma independiente de p53. Tip60 acetila y activa ATM (Eymin et al., 2006). Además ARF es capaz de interactuar con factores de transcripción como

YY1, cofactor transcripcional de p53, que también interacciona con Mdm2. La interacción ARF-YY1 compromete la ubiquitinación de p53 dependiente de Mdm2 (Sui et al., 2004).

En éste trabajo hemos analizado la interacción funcional de ARF con otra proteína supresora de tumores, p33ING1, y la relevancia funcional de ésta interacción en el campo de la supresión tumoral.

2. 1. 3. Regulación de ARF:

Los niveles de la proteína ARF resultan indetectables en células primarias de pase temprano en cultivo o en embriones y en la mayoría de los tejidos de animales jóvenes ya que en condiciones normales de crecimiento no se encuentra activado. La activación de ARF se da bajo unas condiciones específicas en la célula en las que se reciben señales mitogénicas excesivas, como activación de oncogenes o pases seriados en cultivo.

La forma mutada del oncogén Harvey Ras (H-RasV12), es capaz de inducir parada de ciclo celular con características de senescencia celular en células primarias (Serrano et al., 1997). En fibroblastos embrionarios de ratón p19ARF se induce en esta respuesta y es un mediador esencial de la misma. De hecho está descrito que MEFs p19ARF nullos son insensibles a la inducción de senescencia por RasV12 (Groth et al., 2000; Kamijo et al., 1997; Lin and Lowe, 2001; Palmero et al., 1998). Sin embargo, no se ha observado el mismo efecto en ARF durante inducción de senescencia por RasV12 en células humanas, de modo que p19ARF podría tener un papel en senescencia en ratón (Wei et al., 2001).

La sobreexpresión del oncogén MYC también es capaz de activar ARF, y ésta activación deriva en inducción de apoptosis dependiente de p53 (Zindy et al., 1998).

El oncogén adenoviral E1A, es capaz de activar p53 y éste a su vez, sensibiliza a estímulos apoptóticos. Se ha demostrado que ARF se induce por E1A y es necesariotambién en esta ruta de activación de p53, puesto que en ausencia de ARF las células se muestran resistentes al efecto proapoptótico de E1A (de Stanchina et al., 1998).

En presencia del oncogén viral v-Abl, se activa ARF. ARF inhibe la transformación celular por v-Abl, vía p53 (Radfar et al., 1998). Además, se ha descrito recientemente que en modelos de ratón con pérdida de ARF que expresan las mutaciones oncogénicas Bcr-Abl propias de leucemias aumenta la oncogenicidad y responden peor a los tratamientos (Williams et al., 2006).

Los factores de transcripción de la familia E2F, están considerados importantes reguladores de ARF y establecen una relación entre la vía de p53 y la vía de pRb. E2F1, 2 y 3 sobreexpresados son capaces de inducir ARF, siendo E2F1 el único capaz de activarlo directamente. ARF no es un gen diana convencional de los E2Fs. Se ha descrito que ARF se activa sólo en presencia de niveles aberrantes de E2F1 y no oscila durante el ciclo (Lowe and Sherr, 2003; Palmero et al., 2002), además es reprimido por E2F3b que no es uno de los E2Fs represores comunes (Aslanian et al., 2004).

p53 también es represor de ARF. Se ha visto que en células nulas para p53 los niveles de ARF son altos, aunque no está demostrado que sea un efecto transcripcional directo de p53 sobre ARF (Robertson and Jones, 1998; Stott et al., 1998). Esta observación establece un ciclo de retroalimentación entre p53 y ARF, dado que la acumulación de p53 ARF-dependiente limitaría la cantidad del propio ARF. También encontramos un efecto represor en proteínas de la caja T. TBX2, gen que se encuentra en un amplicón en tumores primarios de mama y TBX3 gen mutado característico del Síndrome mamario Ulnar, regulan ARF a través de un sitio T en el elemento iniciador del promotor de ARF (Brummelkamp et al., 2001; Jacobs et al., 2000; Lingbeek, 2002).

El factor de transcripción DMP1 se une directamente a las secuencias consenso del promotor de ARF en ratones (Inoue et al., 1999). RasV12 aumenta la unión de DMP1 al promotor de ARF, y se ha observado que RasV12 no es capaz de activar ARF en MEFs DMP1 deficientes (Sreeramaneni et al., 2005). Se han observados posibles sitios de unión de DMP1 al promotor de ARF humano, pero se desconocen los efectos de DMP1 en células humanas.

Proteínas del grupo Polycomb, como BMI1, CBX7 y CBX8, se han identificado también como represores de ARF y p16INK4a, mediante unión a secuencias reguladoras del locus INK4a/ARF (Bracken et al., 2007; Gil et al., 2004; Kim et al., 2004).

Además, recientemente se ha descrito el elemento denominado RD^{INK/ARF}, origen de replicación 5' de p15INK4b que participa en el silenciamiento transcripcional del locus INK4a/ARF/INK4b (Gonzalez et al., 2006).

3. LA FAMILIA DE PROTEÍNAS ING.

La familia de proteínas ING (*Inhibitor of Growth*) está formada por varias proteínas conservadas evolutivamente, codificadas en cinco loci diferentes en

mamíferos (Fig. 4). Esta familia de proteínas está conectada funcionalmente a p53 a varios niveles, incluyendo el control de la estabilidad de p53, como cofactores transcripcionales o reguladores postraduccionales (Russell et al., 2006; Shi and Gozani, 2005). También participan en procesos de remodelación de cromatina a través de su asociación a histona deacetilasas (HDACs), histona acetil-transferasas (HATs) y mediante su unión a histonas (Feng et al., 2002; Goeman et al., 2005; Kuzmichev et al., 2002; Nourani et al., 2001; Russell et al., 2006; Ruthenburg et al., 2007; Shi and Gozani, 2005; Shi et al., 2006; Skowyra et al., 2001; Vieyra et al., 2002; Xin et al., 2004).

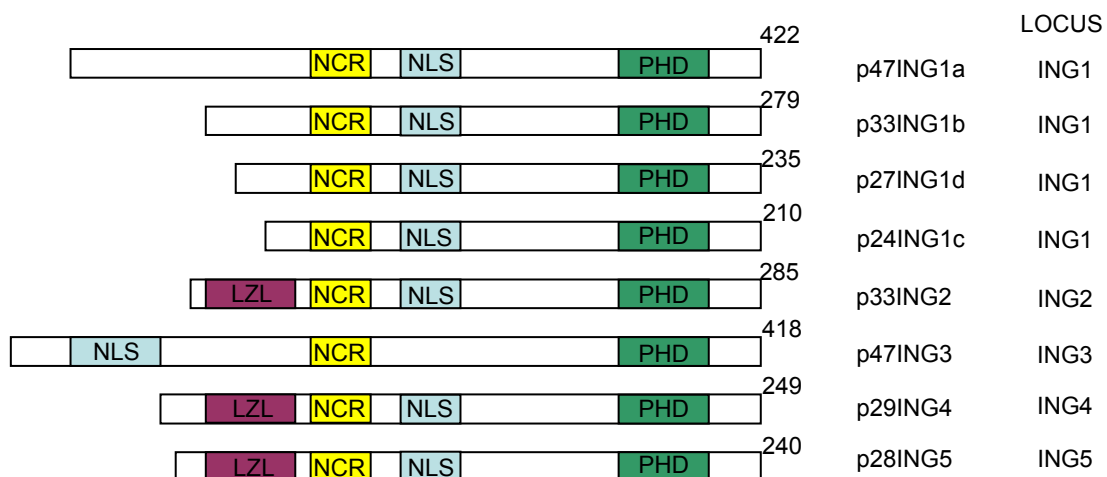


Fig. 4. Familia de proteínas ING. **NCR:** Novel Conserved Region. **NLS:** Secuencia de Localización Nuclear. **PHD:** Plant Homeo Domain. **LZL:** Dominio de cremallera de leucina

Todas las proteínas ING poseen una región altamente conservada en su extremo C-terminal que contiene un motivo PHD (*Plant Homeodomain*), que suele estar involucrado en interacciones proteína-proteína y que se encuentra normalmente en proteínas asociadas con funciones de remodelación de cromatina (Campos et al., 2004; Feng et al., 2002; Gong et al., 2005; Russell et al., 2006).

También existen otras regiones altamente conservadas como la secuencia de localización nuclear (NLS) y la región llamada NCR (novel conserved region) que se ha propuesto como posible dominio de interacción con HATs y HDACs (He et al., 2005). Además, p33ING2, p29ING4 y p28ING5 tienen dominios de cremallera de leucina en la zona N-terminal, que podrían estar implicados en dimerización (Feng et al., 2002; Goeman et al., 2005; Kuzmichev et al., 2002; Nourani et al., 2001; Russell et al., 2006; Shi and Gozani, 2005; Skowyra et al., 2001; Vieyra et al., 2002; Xin et al., 2004).

3.1. ING1

En este trabajo nos hemos centrado en la proteína p33ING1, (también llamado p33ING1b o ING1b, (Feng et al., 2002)) uno de los productos del locus ING1 y el primer miembro de la familia que se definió como “Inhibitor of Growth”. ING1 se identificó mediante una búsqueda de genes con expresión diferencial entre células epiteliales mamarias normales y células de cáncer de mama, intentando identificar nuevos genes supresores de tumores (Garkavtsev et al., 1996).

Es importante destacar que el locus de ING1 humano, se encuentra en el cromosoma 13, en la región q33-34, zona de frecuente pérdida de heterocigosidad. ING1 se encuentra mutado, deletado, silenciado y la proteína p33ING1 posee localización aberrante en un gran número de tumores humanos, lo que apoya su papel como supresor tumoral (Gong et al., 2005; Nouman et al., 2003; Russell et al., 2006). Recientemente se han descrito en modelos de pérdida de función de ING1 en ratones que presentan predisposición a la formación de linfomas (Coles et al., 2007; Kichina et al., 2005), apoyando su papel como supresor tumoral *in vivo*.

3.1.1. Estructura y Localización

El locus ING1 humano da lugar a varios productos por procesamiento alternativo de tres exones 5' a un exón común 3' (exón 2), p47ING1a, p33ING1b y p27ING1d (Fig. 5). Otro producto del locus, p24ING1c, se produce por un codón de iniciación interno en el exón común. El locus de ratón difiere en que no hay evidencias

de la existencia de isoformas p47ING1a y p27ING1d. En concreto la proteína p33ING1 está codificada en un transcrito formado por el exón 1b (1a en humanos) y el exón 2 común. Esta proteína tiene 279 aminoácidos y un peso molecular de 33kD. En el extremo N-terminal encontramos un dominio conservado llamado PIP (PCNA interacting protein motif) de interacción específica con PCNA tras daño a DNA inducido por ultravioleta (UV) (Feng et al., 2002; González et al., 2006; Kuzmichev et al., 2002; Russell et al., 2006; Scott et al., 2001b; Shi and Gozani, 2005).

La localización normal de p33ING1 en la célula es nuclear, aunque se ha descrito la pérdida de ésta localización en algunos tipos de tumores (Nouman et al., 2003; Vieyra et al., 2003).

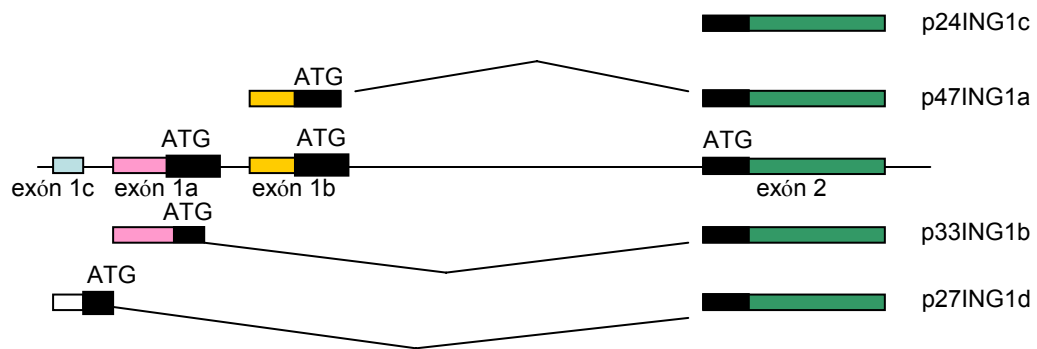


Fig. 5. Estructura del locus ING1.

3. 1. 2. Funciones Biológicas de ING1

p33ING1 provoca inducción de parada del ciclo celular en G1, apoptosis, y favorece reparación de daño a ADN en experimentos de sobreexpresión. (Cheung and Li, 2002; Feng et al., 2002; Garkavtsev et al., 1998; Kataoka et al., 2003; Kuo et al., 2007; Russell et al., 2006).

p33ING1 realiza también un papel importante en la entrada en senescencia. Su sobreexpresión induce senescencia en fibroblastos humanos primarios (Garkavtsev and Riabowol, 1997; Goeman et al., 2005), mientras que su silenciamiento retrasa la entrada en senescencia de los mismos (Garkavtsev and Riabowol, 1997).

Se ha propuesto que p33ING1 está conectado con p53 funcionalmente mediante diversos mecanismos. p33ING1 regula la acetilación de p53, por bloqueo de la histona-

deacetilasa Sir2 (Kataoka et al., 2003), o interacción con las histona acetil transferasas p300/CBP o PCAF (Feng et al., 2002). También se ha descrito estabilización de p53 compitiendo con Mdm2 por el sitio de unión a p53 (Feng et al., 2002; Leung et al., 2002), o actuación de p33ING1 como cofactor de p53, favoreciendo modificación de cromatina mediante complejos HATs/HDACs. Se ha descrito que p33ING1 y p53 podrían desarrollar su acción como supresores tumorales de forma conjunta formando un complejo (Feng et al., 2002). Todas estas evidencias están basadas en experimentos de sobreexpresión, y no está claro su significado biológico.

Otra importante función de p33ING1 es la de represión-activación transcripcional. ING1 participa en regulación de la expresión génica mediante procesos de remodelación de cromatina en asociación con las histona deacetilasas (HDACs) del complejo corepresor mSin3, o con las histona acetil transferasas (HATs) PCAF, CBP, p300 y/o TRRAP. Esta función podría realizarse tanto en conexión con p53 como de forma p53 independiente como en el caso de su interacción con el receptor de estrógenos (Fig. 6) (Feng et al., 2002; Kuzmichev et al., 2002; Russell et al., 2006).

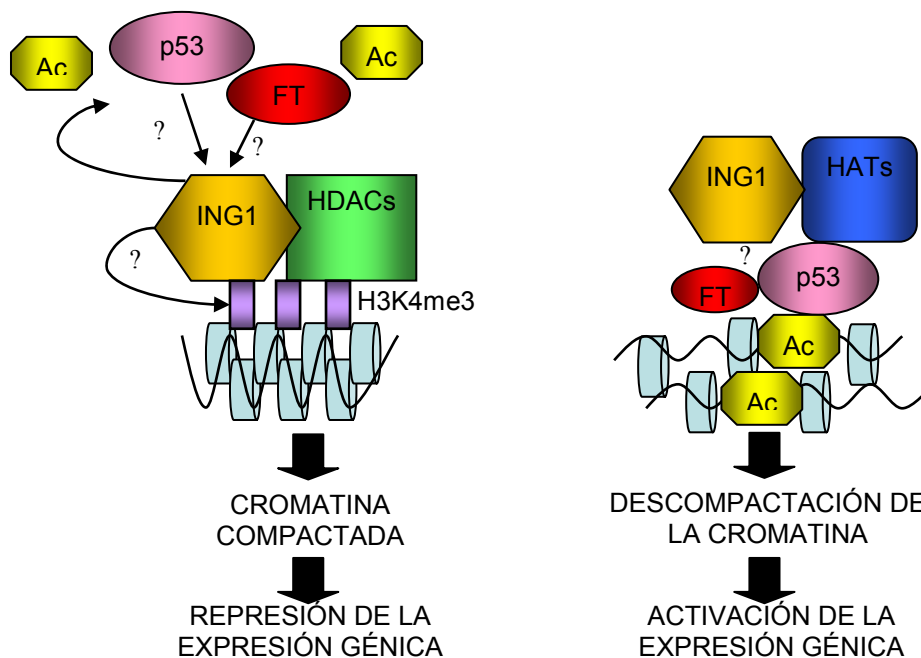


Fig. 6. Regulación de la expresión génica por ING.

HDACs: Histona deacetilasas; **HATs:** Histona acetil transferasas; **FT:** Factores de transcripción; **Ac:** Grupos acetilo. **H3K4me3:** Histona 3 trimetilada en la lisina 4.

En relación con esta función transcripcional se ha descrito recientemente que la familia de proteínas ING, reconoce a la histona H3 metilada en la lisina 4 (H3K4) marcador de cromatina activa, a través del dominio PHD. La unión de ING2 en respuesta a daño en el ADN a H3K4me3 (trimetilada), promueve represión de la expresión de genes implicados en proliferación (Shi et al., 2006). Por otro lado, el dominio PHD de la familia de proteínas ING se une a Fosfatidil-inositol fosfato, molécula de señalización lipídica (Gozani et al., 2003). Esta interacción es esencial en el reclutamiento de ING2 a la cromatina durante respuestas a daño en el ADN. Dado que el dominio PHD es común a todos los miembros de la familia ING, podrían extenderse estas evidencias como posibles funciones de los otros INGs, y entre ellos a p33ING1 (Ruthenburg et al., 2007).

La regulación de p33ING1 es un campo aún bastante inexplorado. Se expresa de forma ubicua y se ha observado que se induce tras exposición a radiación ultravioleta (UV) en células de melanoma (Cheung et al., 2001). También se ha descrito su acumulación en respuesta a la hormona tiroidea en *Xenopus* (Wagner and Helbing, 2005).

Las proteínas p33ING1 y ARF, tal como se ha indicado en la introducción, se encuentran conectadas con la vía de p53. De hecho, ambas se han descrito implicadas en regulación de la estabilidad de p53, y podrían actuar como cofactores de p53.

Dado que al comienzo de este trabajo se conocía muy poco sobre el modo de actuación y la regulación de p33ING1, y ya algunos trabajos apuntaban hacia mecanismos de actuación de ARF como supresor tumoral distintos de su interacción con Mdm2 para regular p53, decidimos indagar en la posibilidad de que existiese conexión funcional entre ARF y p33ING1, lo que nos permitiría investigar más a fondo sobre p33ING1 y buscar un nuevo mecanismo de supresión tumoral para ARF.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Líneas celulares:

En este trabajo hemos utilizado las siguientes líneas celulares humanas: células 293T epiteliales de riñón que expresan el antígeno T del virus SV40 (DuBridgde et al., 1987), células H1299 de carcinoma de pulmón de células pequeñas, células U2OS de osteosarcoma, células NARF2 derivadas de las células U2OS con un promotor inducible con IPTG para p14ARF (Stott et al., 1998) (cedidas por Gordon Peters, Cancer Research UK, Londres), la línea celular EMG, generada en nuestro laboratorio sobre las células NARF2, con expresión inducible de ARF y p33ING1 (ver más adelante).

La línea celulares de ratón utilizada fueron fibroblastos de ratón inmortalizados NIH3T3. También hemos usado fibroblastos embrionarios de ratón de pase temprano (MEFs, Mouse Embryonic Fibroblasts), de genotipo salvaje preparados en el laboratorio como se ha descrito (Palmero and Serrano, 2001), ARF^{-/-} (Kamijo et al., 1998) (cedidos por Manuel Serrano, CNIO, Madrid), y p53/Mdm2^{-/-} (McMasters et al., 1996) (cedidos por Gigi Lozano, Anderson Cancer Center, Houston, USA).

Todas las células utilizadas se mantuvieron en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle médium, Gibco) con 10% de suero fetal (Fetal Calf Serum, Gibco) y antibióticos (Penicilina/Estreptomina). Los cultivos se mantuvieron en incubadores a 37° C, 5% CO₂ y 95% de humedad.

2. Experimento de privación de suero en NIH3T3:

Para este experimento se retiró el medio DMEM con suero (FCS) al 10% a los fibroblastos NIH3T3 y se les lavó tres veces con PBS 1X para eliminar los restos de suero. Posteriormente se incubaron con medio DMEM al 0,5% de suero durante 48 horas para llevarlos así a estado quiescente. Después se plaquearon como se indica más adelante para el experimento de incorporación de BrdU.

3. Transfecciones:

Las transfecciones transitorias en células 293T se realizaron mediante el método de transfección por precipitados de fosfato cálcico, siguiendo el protocolo de transfección descrito previamente (Palmero and Serrano, 2001).

Las transfecciones en la línea celular NIH3T3 y la generación de la línea celular EMG se realizaron con el reactivo FuGene6 (Roche).

4. Transducción retroviral:

Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) de pase temprano de los genotipos mencionados anteriormente se infectaron con los retrovirus ecotrópicos relevantes siguiendo el protocolo descrito previamente (Palmero and Serrano, 2001).

5. Generación de la línea celular EMG:

Esta línea celular se generó mediante transfección con FuGene6 (Roche) de la línea NARF2 con la construcción pWZL-Blast-rtTA seguida de transfección por el mismo método con la construcción pHRS-AU5-ING1b que contiene el promotor *Tet On* inducible

por Doxiciclina y se seleccionaron varios clones transfectados de forma estable en presencia de Puomicina (2 µg/ml).

6. Ensayo de plaqueo a baja densidad

Plaqueamos las células EMG a baja densidad (5×10^4 células/p100), las dejamos crecer durante 10 días en las diferentes condiciones de inducción y después fijamos con formaldehído (Riedel-de Haën) y teñimos con Giemsa (SIGMA).

7. Incorporación de timidina tritiada:

Para este ensayo los MEFs se plaquearon en placas multipocillo de 96, a una densidad de 2000 células por pocillo y por triplicado en DMEM al 10% de FCS. A las 24 horas del plaqueo se cambió el medio por medio con Metil-³H-timidina (Amersham) a razón de 1 µCi por pocillo. A las 24 horas se retiró el medio de los pocillos, se lavaron con PBS y se tripsinizaron las células de cada pocillo con 100 µl de tripsina-EDTA (GIBCO) durante 5 minutos y se congelaron a -20°C hasta su uso.

Para medir la incorporación se utilizó un aparato Cell Harvester (Inotech) que transfiere las células de los pocillos automáticamente a un filtro de fibra de vidrio

(Wallac), sobre el que se funde una lámina de líquido de centelleo (Perkin Elmer) y se midió en un contador de centelleo líquido (1450 Microbeta Trilux, Wallac).

8. Incorporación de BrdU:

Para este ensayo las células se plaquearon como se ha indicado para inmunofluorescencia, se les dió un pulso de BrdU (10 μ M, SIGMA) de 2 a 6, y posteriormente se procesaron para inmunofluorescencia con un anticuerpo primario anti-BrdU BP40250 (Megabase Research Products, dilución 1:1000), y un posterior secundario acoplado a fluorocromo. Se contaron al microscopio de fluorescencia las células que habían incorporado BrdU. Al menos 200 células se contaron en cada experimento.

9. Western Blot:

El análisis de proteínas se realizó mediante el método de Western Blot o inmunoblot. Los lisados totales de las células para análisis de proteínas fueron preparados como se ha descrito previamente (Palmero et al., 2002; Pantoja and Serrano, 1999).

La cuantificación de los lisados se realizó por el método Lowry (Lowry Protein Assay, Bio Rad). Posteriormente, 20-30 μ g de los lisados totales se separaron en geles SDS-PAGE de acrilamida-bisacrilamida (40%, Bio Rad) en los que la fracción separadora estaba preparada al 12%. Tras la electroforesis los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa con 0,2 μ m de tamaño de poro (Bio Rad). Estas membranas fueron bloqueadas con leche al 5% en PBS-Tween 0,2% como paso previo a la incubación con los anticuerpos primarios relevantes en cada caso (Tabla 1).

Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en leche al 5% en PBS-Tween 0,2%.

Para la detección de los anticuerpos primarios, tras 3 lavados con PBS-Tween 0,2% se incubó sobre ellos con su correspondiente anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (Tabla 2).

Las membranas se revelaron por autorradiografía tras lavados con PBS-Tween 0,2% e incubación con ECL (Amersham).

10. Cuantificación de Western Blot:

Para la cuantificación de las bandas de proteínas en los ensayos de Western Blot se realizaron fotografías digitales de las exposiciones elegidas en cada caso y se cuantificaron según el área en píxeles con el programa analiSIS (Soft Image System, GmbH).

11. Inmunoprecipitación:

Los lisados totales de las células 293T transfectadas transitoriamente para inmunoprecipitación fueron preparados como se ha descrito previamente (Palmero et al., 2002; Pantoja and Serrano, 1999) a las 48 horas de la transfección transitoria. Para la inmunoprecipitación se usaron lisados con 1 mg de proteína que se incubaron con 1 μ l de anticuerpo toda la noche a 4°C, en rotación constante. 30 μ l de una matriz de proteína A-agarosa (Pharmacia) prebloqueada con leche al 3% en solución de lisis de proteínas una hora a 4°C, se añadieron a los inmunoprecipitados, y se incubaron durante una hora en las mismas condiciones. La matriz se lavó después 4 veces con solución de lisis y se incubó con 20 μ l de tampón de carga con SDS 2X, 5 min a 90°C para recuperar las proteínas unidas. La presencia de cada proteína se detectó por Western Blot.

12. Inmunofluorescencia

Las células usadas para inmunofluorescencia se crecieron en portas especiales de cristal (Labtek), y se transfectaron con FuGene6 (Roche) en éstos. 24 horas después las células se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS, se permeabilizaron con Tritón X100 al 0,1% en PBS y se incubaron en solución de bloqueo (2% de BSA en PBS) toda la noche a 4°C. Después las células se incubaron durante 60 minutos con los anticuerpos relevantes en la misma solución de bloqueo a temperatura ambiente, y se lavaron con PBS (3-4 lavados) antes de la incubación con los anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos (Tabla 2). Tras lavados del modo anterior, las células se montaron con Vectashield con DAPI (Laboratorios Vector), y se analizaron en microscopio de fluorescencia ZEISS Axiophot o en microscopio confocal Leica SP2.

En los ensayos con células transfectadas con proteínas de fusión fluorescentes (Ds-RedING1 y GFP-ARF) se montaron directamente con Vectashield con DAPI 24 horas después de la transfección.

13. Inmunización para la generación de un anticuerpo policlonal de conejo contra la proteína p33ING1:

Para la inmunización de los conejos (se realizó por duplicado), se utilizó un péptido de síntesis química (Invitrogen) contra el extremo C-terminal de p33ING1 humana con la siguiente secuencia de aminoácidos: CMDKALEKSKKERAYNR.

Antes del primer inóculo se le practicó a los conejos un sangrado preinmune.

El péptido se unió a una proteína “carrier”, KLH (PIERCE) para conferirle al péptido capacidad inmunogénica. El primer inóculo se realizó mezclando el péptido-KLH con el adyuvante Freund’s completo (PIERCE).

El día 14 después del primer inóculo se les inyectó el primer recuerdo con una mezcla del péptido-KLH con el adyuvante Freund’s incompleto (PIERCE), que se repitió el día 28. El primer sangrado test se realizó el día 38 del proceso. El día 42 se realizó el tercer recuerdo, y el 56 el cuarto, igual que los anteriores, realizando un segundo sangrado test el día 66. El quinto y sexto recuerdos se realizaron los días 70 y 84 respectivamente, también con el adyuvante Freund’s incompleto (PIERCE), y el sangrado total se realizó el día 94.

Los sangrados se dejaron toda la noche a 4°C para evitar la hemólisis. Para aislar el suero de los sangrados se centrifugó la sangre a 4000 rpm durante 20 minutos a 4°C, y después el suero fue alicuotado.

PROTEÍNA	ANTICUERPO	ORIGEN	DILUCIÓN	PROCEDENCIA
p14ARF	DP40, 54-75	Policlonal Conejo	1:500	David Parry, DNAX Research Institute
p19ARF	R562,	Policlonal Conejo	1:200	Abcam Ab-80
p33ING1	LG1	Policlonal Conejo	1:500	Generado en el laboratorio
AU5 Tag	MMS-135R	Monoclonal Ratón	1:1000	Babco MMS-135R

hp53	DO-1	Monoclonal Ratón	1:500	Santa Cruz Sc-126
mp53	CM5	Policlonal Conejo	1:500	Novocastra NCL-P53-CM5p
p21CIP1	C19	Policlonal Cabra	1:500	Santa Cruz Sc-397
Mdm2	2A10	Monoclonal Ratón	1:50	Calbiochem OP115
β -ACTINA	AC-15	Monoclonal Ratón	1:10000	Sigma A5441

Tabla 1. Lista de anticuerpos primarios utilizados en este trabajo.

ANTICUERPO	ORIGEN	DILUCIÓN	PROCEDENCIA
Anti- Ig ratón	Policlonal Cabra	1:5000	Dako P 0447
Anti- Ig conejo	Policlonal Burro	1:5000	Amersham NA934
Anti- Ig cabra	Policlonal Conejo	1:3000	Dako P 0160
Alexa 488 conejo/ratón	Policlonal Ratón/cabra	1:500	Invitrogen A11029/A11059
Alexa 594 Conejo/ratón	Policlonal Ratón/cabra	1:500	Invitrogen A11005/A11062

Tabla 2. Lista de anticuerpos secundarios utilizados en este trabajo.

14. Ensayos de Citometría:

Para el ensayo de viabilidad celular, MEFs de genotipo salvaje y ARF^{-/-}, fueron infectados con retrovirus que expresaban p33ING1 (pLPC-AU5-p33ING1) o vector vacío (pLPC). Tras la selección se realizó una tripsinización leve con tripsina-EDTA diluída 1:2 (Gibco) durante un minuto para recoger las células, evitando así una posible permeabilización y se añadió ioduro de propidio (PI 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a una solución de éstas células, y fueron analizadas por citometría de flujo en un citómetro FACScan II (Becton-Dickinson). Se midió el porcentaje de los MEFs que incorporaron el ioduro de propidio, considerándolos como no-viables. Para el ensayo de ciclo celular en EMG se recogieron las células mediante tripsinización con Tripsina-EDTA (Gibco) tras las inducciones pertinentes y se fijaron en etanol al 70%. Posteriormente fueron

resuspendidas en PBS con yoduro de propidiiio (1 mg/ml) y ARNasa (10 mg/ml), y las muestras adquiridas en el citómetro. Se adquirieron 5000 eventos por muestra.

En el caso de ensayos de ciclo celular en EMG para observar el porcentaje de células en subG0-G1, se recogieron también las células del sobrenadante para el análisis.

15. Vectores de expresión :

CONSTRUCCIÓN	TIPO	INSERTO	ORIGEN
pLPC-AU5-p33ING1	Vector Retroviral	hp33ING1 Proteína completa	Clonado durante este trabajo.
pLPC-AU5-ING1 (1-171) (p33ING1-N)	Vector Retroviral	hp33ING1 aminoácidos 1 al 171	Aria Baniahmad Universidad Friedrich Schiller. Jena, Alemania
pLPC-AU5-ING1 (172-279) (p33ING1-C)	Vector Retroviral	hp33ING1 aminoácidos 172 al 279	Aria Baniahmad Universidad Friedrich Schiller. Jena, Alemania
Ds-Red-p33ING1	Vector de fusión a proteína fluorescente Ds-Red	hp33ING1 Proteína completa	Clonado durante este trabajo.
pLPCp14ARF	Vector Retroviral	p14ARF Proteína completa	Manuel Serrano CNIO Madrid, España.
pEGFP-p14ARF	Vector de fusión a proteína fluorescente EGFP	p14ARF Proteína completa	Gordon Peters Cancer Research UK Londres, Reino Unido
pCLEco	Vector de expresión de proteínas de retrovirus ecotrópico	gag-pol	Antonio Bernad CNIC Madrid, España.
pWZL-Blast-rtTA	Vector Retroviral	rtTA	Aria Baniahmad Universidad Friedrich Schiller. Jena, Alemania
pHRS-AU5-p33ING1	Vector de expresión de un promotor <i>Tet On</i> inducible por doxiciclina.	hp33ING1 Proteína completa	Aria Baniahmad Universidad Friedrich Schiller. Jena, Alemania

4. OBJETIVOS

1. Caracterizar la interacción física entre p33ING1 y ARF, y acotar el dominio de p33ING1 implicado en la interacción.
2. Estudiar los efectos de la interacción en la localización subcelular de p33ING1 y ARF.
3. Investigar si existe conexión funcional entre p33ING1 y ARF. Buscar posibles efectos de ARF sobre las funciones de p33ING1 en el marco de su asociación.
4. Caracterizar un modelo celular doblemente inducible para p33ING1 y p14ARF.

5. RESULTADOS

1. INTERACCIÓN FÍSICA ENTRE p33ING1 Y p14ARF

El primer paso para estudiar la posible relación entre ambos supresores de tumores, fue utilizar el método de inmunoprecipitación de proteínas, el cual nos permitiría identificar la interacción física como primera aproximación al posterior estudio funcional. Para realizar este experimento, transfectamos transitoriamente células 293T, con vectores que codifican para ambas proteínas, p14ARF y una versión de p33ING1 con el tag AU5. Se realizó el experimento de inmunoprecipitación seguido de Western Blot, y observamos que se encontraban las dos proteínas en el inmunocomplejo, tanto en la inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-p14ARF como en la reversa con un anticuerpo contra el tag AU5 (Figs. 1a y b).

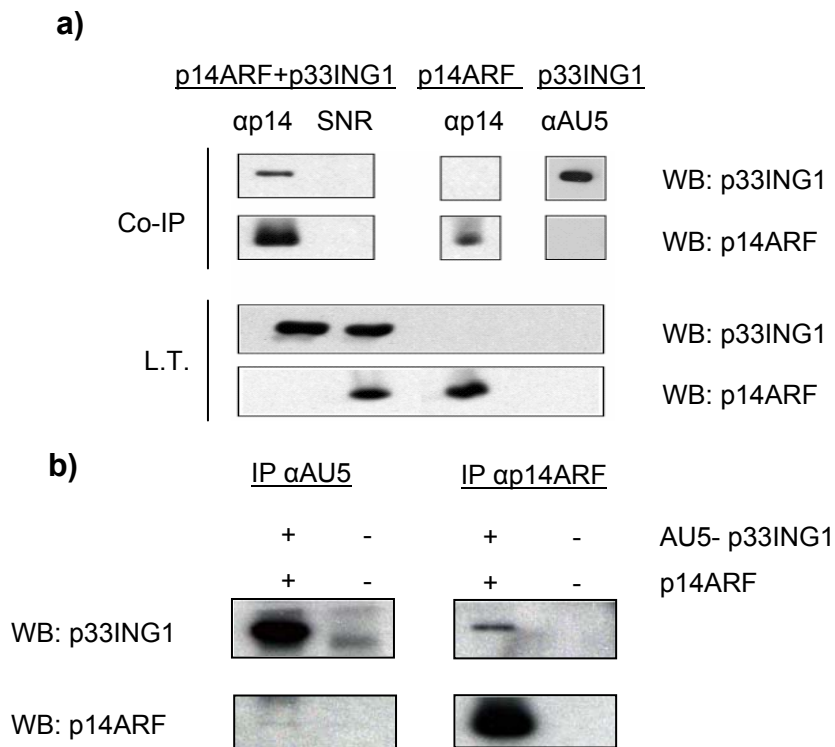


Fig. 1. Interacción de las proteínas ectópicas. (a) Células 293T fueron transfectadas con vectores que codifican para p33ING1 y p14ARF e inmunoprecipitados con anticuerpos anti-p14ARF y anti-AU5 o con un suero no relacionado (SNR). La presencia de cada proteína en el inmunocomplejo se detectó por Western Blot (WB) usando anticuerpos anti-p14ARF y anti-AU5. También se muestran los controles con células transfectadas sólo con p14ARF o p33ING1. El panel inferior muestra el análisis por Western Blot de los lisados totales usados en las inmunoprecipitaciones anteriores. (b) Células 293T fueron transfectadas y analizadas como en a, usando anticuerpos anti-p14ARF y anti-AU5 para la inmunoprecipitación. Co-IP: coprecipitación. L.T.: Lisados totales.

La eficiencia del anticuerpo anti-p14ARF al arrastrar p33ING1 en el inmunocomplejo es mayor a la de anti-AU5 de coprecipitar p14ARF. La interacción era específica, como se demuestra en el control de inmunoprecipitación con un suero no relacionado. Estos resultados muestran que ambas proteínas se pueden asociar en la célula.

Quisimos confirmar los datos obtenidos con proteínas ectópicas intentando ver la interacción entre las proteínas endógenas, para valorar así si la interacción poseía un carácter fisiológico. Utilizamos para ello en primer lugar, la línea celular 293T que anteriormente transfectamos de forma transitoria. Usamos el mismo anticuerpo anti-p14ARF y para detectar p33ING1, el antisuero LG1 generado en el laboratorio contra el extremo C-terminal de p33ING1 de la proteína (ver Materiales y Métodos). Aunque las células 293T expresan muy poca cantidad de p14ARF endógeno, mediante inmunoprecipitación fuimos capaces de detectar de nuevo a las dos proteínas en el inmunocomplejo (Fig. 2a). Con el fin de confirmar éstos resultados con otra línea celular, utilizamos la línea humana H1299 de carcinoma de pulmón de células pequeñas, que elegimos por expresar niveles comparables de p33ING1 y p14ARF. En este segundo caso, también observamos ambas proteínas en el inmunocomplejo, inmunoprecipitando con anti-p14ARF seguido de Western Blot con el suero LG1 (Fig. 2b).

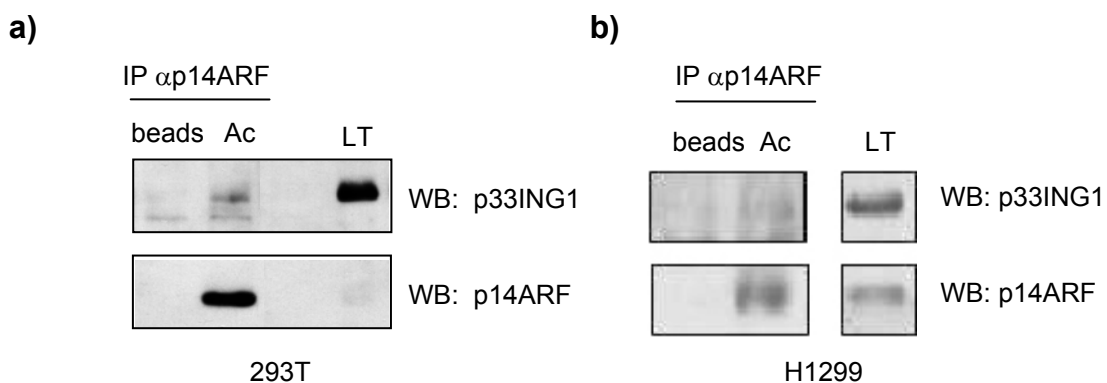


Fig. 2. Interacción de las proteínas endógenas. (a) Células 293T sin transfectar se analizaron por inmunoprecipitación, usando un anticuerpo anti-p14ARF (Ac) o beads de agarosa sin anticuerpo. Las proteínas inmunoprecipitadas fueron detectadas por Western Blot. p33ING1 endógeno se detectó con el suero LG1. (b) Células H1299 sin transfectar se analizaron por inmunoprecipitación y Western Blot como en a. L.T.:Lisados totales.

1. 1. Dominios de p33ING1 implicados en la interacción

El siguiente paso en nuestro intento por caracterizar la interacción física entre p33ING1 y p14ARF, fue intentar acotar el dominio implicado de p33ING1. Para ello, utilizamos construcciones retrovirales con el tag AU5 para la expresión de dos mutantes de delección de p33ING1, correspondientes a la mitad N-terminal de la proteína, con los aminoácidos del 1-171 (pLPC-p33ING1-N), y la región C-terminal de la proteína, con los aminoácidos del 172-279 (pLPC-p33ING1-C) (Goeman et al., 2005) (Fig. 2)

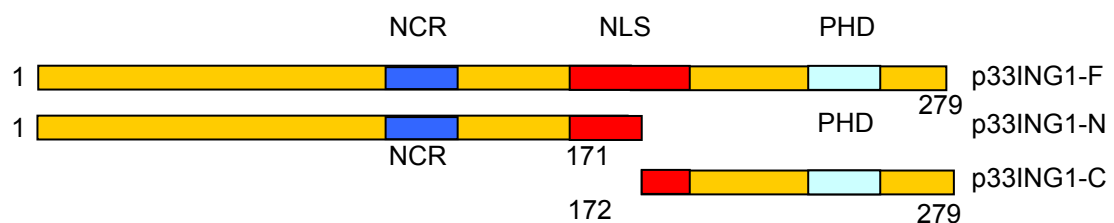


Fig. 3. Delecciones de p33ING1.

Co-transfectamos las construcciones correspondientes a la proteína p33ING1 completa y los dos mutantes de delección con p14ARF, en células 293T, e inmunoprecipitamos con anti-AU5 y con anti-p14ARF (Fig. 4).

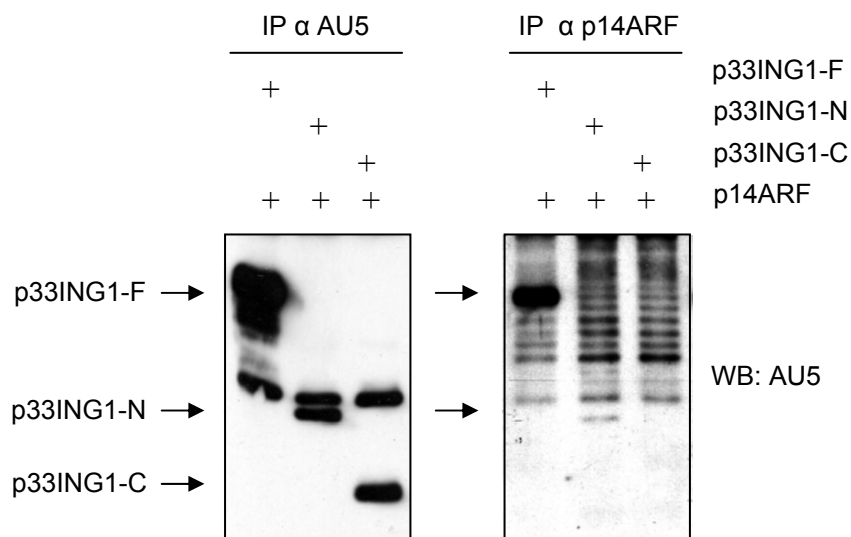


Fig. 4. Interacción del dominio N-terminal de p33ING1 con p14ARF. Células 293T se transfectaron con p14ARF y las construcciones de delección de p33ING1 con el tag AU5 que se indican, y se analizaron por inmunoprecipitación seguida de Western Blot . La exposición del panel derecho es 3 veces más larga que la del izquierdo.

El posterior análisis por Western Blot reveló que la construcción N-terminal de p33ING1 había co-precipitado con p14ARF, pero no la C-terminal (Fig. 4). Sin embargo, la eficiencia de la co-precipitación del extremo N-terminal fue menor que con la proteína completa. Con estos resultados podemos concluir que el extremo N-terminal de p33ING1, hasta el aminoácido 171 de la proteína completa, es suficiente para la interacción con ARF.

2. EFECTOS DE LA INTERACCIÓN EN LOCALIZACIÓN SUBCELULAR

Una vez observada la interacción física, teniendo en cuenta el efecto que ARF tiene en la localización de otras proteínas con las que interacciona, decidimos hacer ensayos de inmunofluorescencia para investigar un posible efecto de ARF en la localización de p33ING1.

2. 1. p14ARF favorece la acumulación de p33ING1 en el nucleolo.

Utilizamos en primer lugar la línea NIH3T3 de fibroblastos inmortalizados de ratón, que no expresan ARF endógeno porque poseen una delección del locus INK4a/ARF (Sherr, 2001b). Transfectamos de forma transitoria con vectores que expresan p14ARF, AU5-p33ING1 o ambos cotransfectados (Fig. 5a). La distribución normal de p14ARF es nucleolar y la de p33ING1 predominantemente nuclear pero sin estar excluido del nucleolo (Scott et al., 2001a; Scott et al., 2001b). El resultado que observamos por inmunofluorescencia indirecta mediante incubación con anticuerpos fue una relocalización nucleolar de p33ING1 al expresar ARF ectópico. La localización de ARF no se vio afectada por la expresión de p33ING1 (Fig. 5a y 5b).

Como segunda aproximación al estudio de la repercusión de los niveles de ARF en la localización subcelular de p33ING1, y para comprobar nuestro primer resultado, decidimos analizar la localización de p33ING1 aumentando los niveles de ARF endógeno. Dado que estaba descrita la inducción de p19ARF por RasV12 en MEFs de pase temprano (Palmero et al., 1998; Serrano et al., 1997), realizamos una infección de estas células con vectores retrovirales que codificaban para RasV12 y vector vacío. Posteriormente los MEFs fueron transfectados con p33ING1.

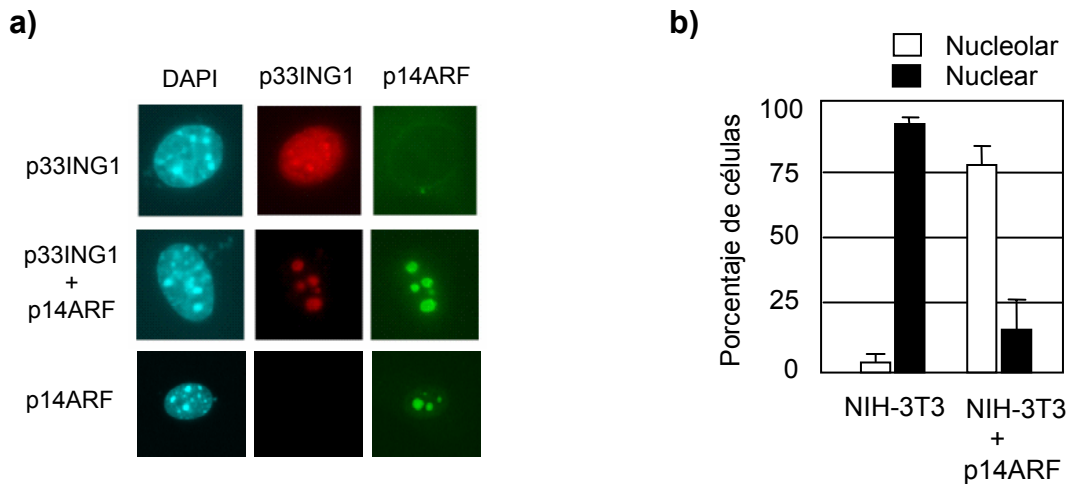


Fig. 5. Efectos de los niveles de p14ARF en la localización subcelular de p33ING1.

(a) Células NIH3T3 transfectadas con AU5-p33ING1, p14ARF o ambos según se indica y analizados por inmunofluorescencia con anticuerpos anti-p14 y anti-AU5. (b) Porcentaje de células que muestran tinción para p33ING1 predominantemente en el nucleolo, o distribuida por el núcleo, en ausencia o presencia de p14ARF. Los datos mostrados son media de dos experimentos. Al menos 200 células fueron contadas para cada punto.

Los niveles de p19ARF aumentaron con la infección de RasV12 como se detecta por inmunofluorescencia (Fig. 6a) y por Western Blot (Fig. 6b). De nuevo observamos la relocalización al nucleolo de p33ING1 aunque menos dramática que en el experimento anterior, resultado que no observamos en los MEFs no infectados con RasV12, con niveles basales de p19ARF, en los cuales p33ING1 mantenía su distribución nuclear normal (Fig. 6a).

El siguiente paso para caracterizar este efecto, fue analizar si el efecto observado de relocalización de p33ING1 dependía de p53 o Mdm2. Para ello utilizamos MEFs inmortalizados doblemente deficientes para p53 y Mdm2, los cuales además poseen unos niveles endógenos de p19ARF elevados como se muestra en el análisis por Western blot (Fig. 7b). Estos MEFs, al ser transfectados de forma transitoria con p33ING1, muestran cierta acumulación en el nucleolo, presumiblemente por los altos niveles de ARF endógeno.

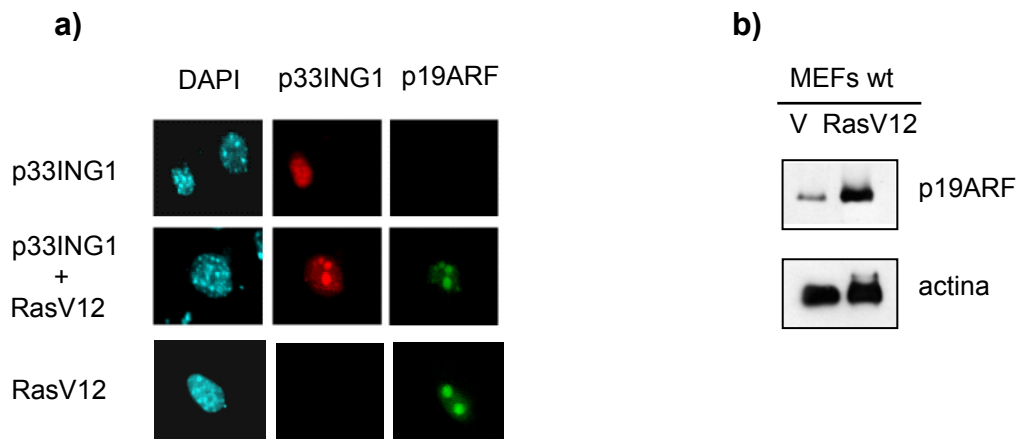


Fig. 6. Efectos de los niveles de p19ARF endógeno en la localización de p33ING1. (a) Inmunofluorescencia indirecta de MEFs de genotipo salvaje transfectados con p33ING1 en el panel superior, infectados retroviralmente con RasV12 y transfectados con p33ING1 en el intermedio o sólo infectados con RasV12 en el inferior. (b) Western Blot comparando los niveles de p19ARF de los MEFs de genotipo salvaje usados en (a) infectados con vector vacío o con RasV12.

El efecto es mayor cuando además co-transfectamos p14ARF en ellos (Fig. 7a). Los resultados mostraban que la acumulación en nucleolo de p33ING1 en presencia de ARF es independiente de p53 y Mdm2.

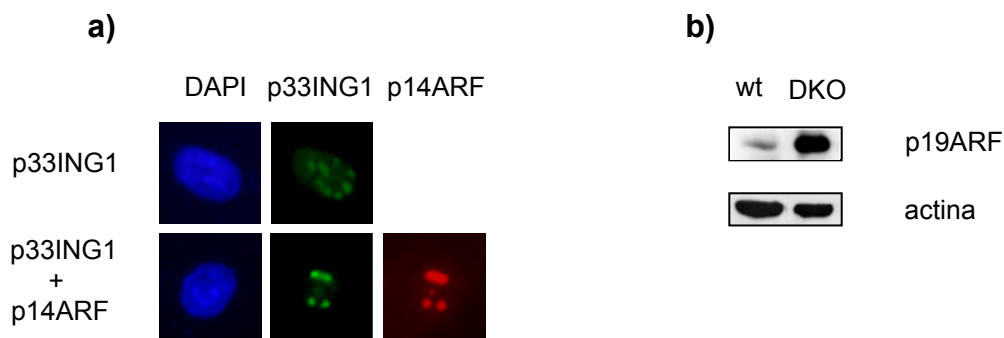


Fig. 7. Acumulación de p33ING1 en el nucleolo en ausencia de p53 y Mdm2. (a) Inmunofluorescencia indirecta de MEFs doblemente deficientes para p53 y Mdm2 transfectados sólo con p33ING1 en el panel superior y cotransfectados con p14ARF en el inferior. (b) Western Blot de los niveles de p19ARF en los MEFs usados en (a) y control de carga mediante Western Blot de actina.

Para comprobar los efectos que veíamos en localización utilizamos otro abordaje, esta vez co-transfectando p14ARF y p33ING1 en construcciones con proteínas de fusión fluorescentes. Cotransfectamos en las células 293T las construcciones dsRedp33ING1 en la que p33ING1 va fusionado a la proteína fluorescente dsRed, y GFP-p14ARF, en la que p14ARF va fusionado a la proteína fluorescente verde GFP. El resultado fue un cambio de localización de p33ING1 similar a los experimentos anteriores (Fig. 8) lo que apoya que ARF favorece la acumulación nucleolar de p33ING1.

Este experimento nos sirvió también para descartar que éste cambio de la localización de p33ING1 pudiera deberse la parada del ciclo inducida por sobreexpresión de ARF, ya que la línea celular 293T expresa el antígeno T del virus SV40 y las proteínas adenovirales E1A y E1B, que inhiben la acción de p53 (Pomerantz et al., 1998) por lo que estas células son inmunes al efecto antiproliferativo de p14ARF.

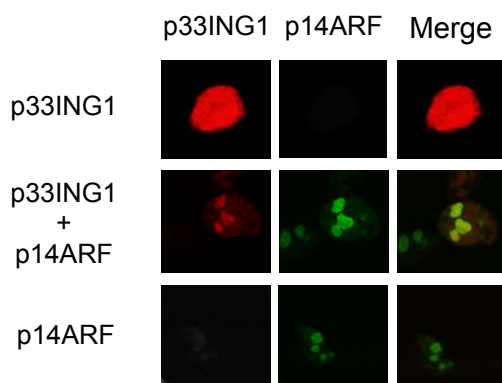


Fig. 8. Inmunofluorescencia en células 293T con proteínas de fusión fluorescentes. Células 293T fueron transfectadas con los vectores Ds-Red-p33ING1 y GFP-p14ARF y se analizaron por inmunofluorescencia directa.

Para confirmar de nuevo que la relocalización nucleolar era efecto directo de ARF, utilizamos fibroblastos inmortalizados NIH3T3 que no expresan ARF, y se cultivaron en condiciones de 0,5% de suero (FCS) en lugar de en condiciones normales al 10% de suero, lo que supuso una disminución de su tasa de proliferación medida por incorporación de BrdU tras 48 horas, del 15% en el control a menos del 5% en presencia de 0,5% de suero. p33ING1 sobreexpresado ectópicamente, de nuevo mantenía la localización nuclear uniforme tanto en presencia de 10% de suero como en presencia de 0,5% de suero (Fig. 9). El resultado mostraba que la acumulación de p33ING1 en el nucleolo no era una consecuencia de la disminución de la tasa de proliferación.

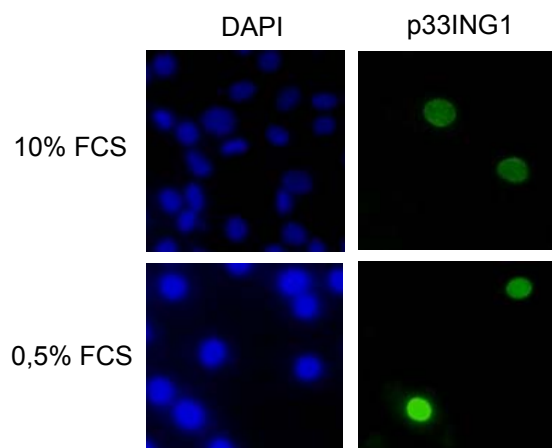


Fig. 9. Localización de p33ING1 ectópico en células NIH3T3 en condiciones de privación de suero. (a) Inmunofluorescencia indirecta por sobreexpresión de pLPC-AU5-p33ING1 y detección con un anticuerpo anti-AU5 en células NIH3T3 en presencia de 10% de FCS o al 0,5% de FCS.

2. 2. Efectos en la localización subcelular de los dominios de p33ING1.

Tras haber demostrado los efectos de ARF en la localización subcelular de la proteína p33ING1 completa, nos preguntamos si también la presencia de ARF tendría repercusión en la localización de los mutantes de delección que usamos anteriormente para identificar la región implicada en la interacción con ARF (Fig. 3). Para ello en primer lugar analizamos la localización de estos mutantes mediante inmunofluorescencia indirecta transfectando las construcciones que expresaban la proteína completa y las delecciones en la línea celular 293T. Observamos que en ambos mutantes se pierde la localización exclusivamente nuclear. La expresión de la construcción que contiene el extremo N-terminal (aminoácidos 1 al 171) de la proteína está distribuido en núcleo y citoplasma. El otro extremo, el C-terminal, es predominantemente nuclear pero también hay algo de expresión en el citoplasma, e incluso es representativo el número de células donde está excluido del nucleolo. Este efecto se podría deber a la región donde se encuentra la que se ha descrito como la señal de localización nuclear (NLS), que queda dividida entre ambos mutantes (Fig. 10) (ver Discusión).

Una vez comprobada la localización de los mutantes realizamos una cotransfección de las construcciones con las delecciones de p33ING1 con p14ARF también en células 293T.

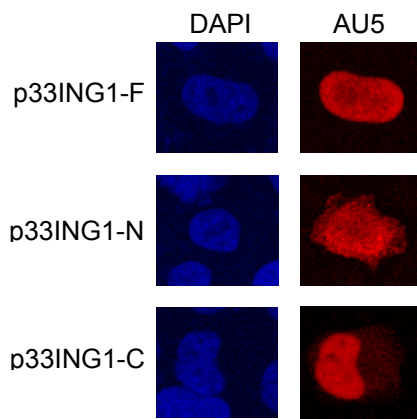


Fig. 10. Localización de las deleciones de p33ING1 por inmunofluorescencia en células 293T. Se transfectaron las deleciones N-terminal (N) y C-terminal (C) y la proteína completa (F) en la línea celular 293T. Se detectaron por inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo anti-AU5.

No conseguimos ver en ningún caso y tras varios experimentos un cambio de localización en los mutantes tan claro como el de la proteína completa (Fig. 11). Ya que ambas deleciones han perdido la localización únicamente nuclear, interpretamos que ésta capacidad influyera también en la interacción y relocalización nucleolar inducida por p14ARF (ver Discusión).

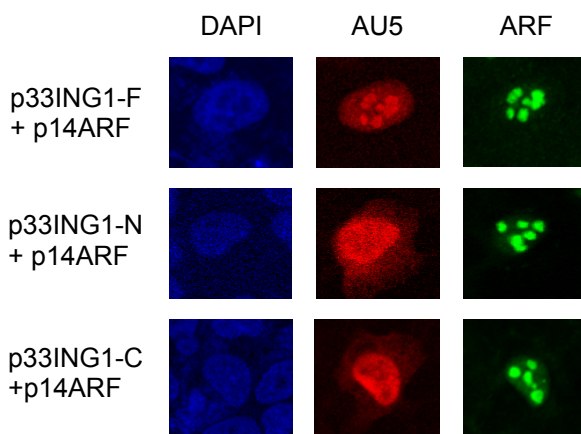


Fig. 11 . Localización de las deleciones de p33ING1 con p14ARF.

Se cotransfectaron las deleciones N-terminal (N) y C-terminal (C) y la proteína completa (F) en la línea celular 293T junto con p14ARF. Se detectaron por inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos contra p14ARF y el tag AU5.

3. ESTUDIO FUNCIONAL DE LA INTERACCIÓN

Para llevar a cabo un estudio funcional de la conexión entre p14ARF y p33ING1 hemos utilizado un modelo con el que pretendíamos explorar la posible repercusión de ARF en los efectos sobre el ciclo celular y la transactivación de genes diana de p53 descritos para p33ING1 (Nagashima et al., 2001; Shinoura et al., 1999). Nuestro modelo experimental fueron fibroblastos embrionarios de ratón de pase temprano (MEFs). En primer lugar, analizamos los efectos de la expresión ectópica de p33ING1 en MEFs de

genotipo salvaje, mediante transducción retroviral. Tras la infección retroviral de p33ING1 en los MEFs wt, y un periodo de selección de las células infectadas, se observó una reducción de la tasa de síntesis de ADN midiéndola por incorporación de Timidina tritiada o por incorporación de BrdU (Figs. 12a y b). Finalmente, se comprobó que los MEFs infectados con p33ING1 sufrían un cambio de morfología adaptando una forma aplanada, similar a células senescentes (Fig. 12c).

Por tanto, la sobreexpresión de p33ING1 en MEFs de genotipo salvaje provoca una respuesta antiproliferativa con rasgos de senescencia celular.

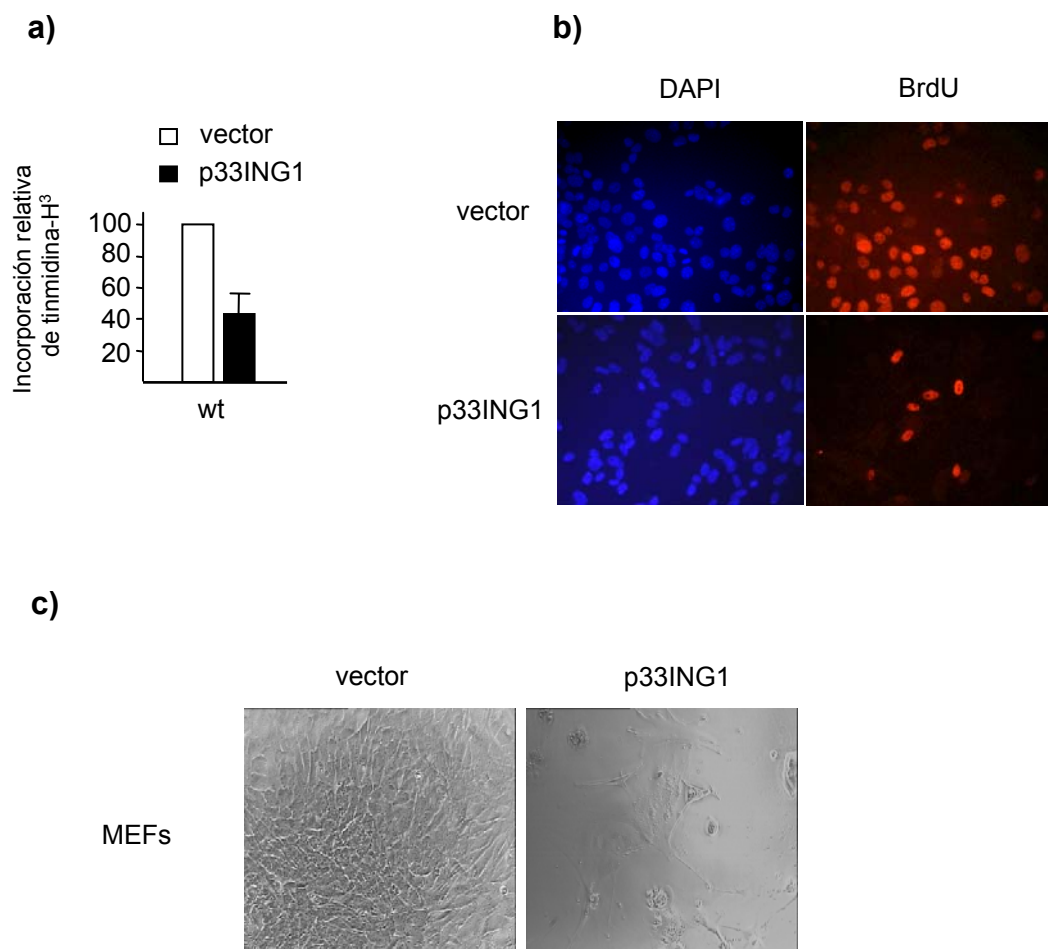


Fig. 12. Tasa de proliferación y morfología de los MEFs wt. (a) Incorporación relativa de timidina- H^3 . Los datos mostrados son la media de 4 experimentos independientes. (b) Incorporación de BrdU analizada por inmunofluorescencia. (c) Morfología (Aumento 200x). Todos los datos se muestran a 72 horas post-selección.

3. 1. Requerimiento de p19ARF para la parada del ciclo inducida por p33ING1.

Para analizar el posible papel de ARF en este fenotipo provocado por p33ING1, decidimos comparar los efectos de la sobreexpresión de p33ING1 en los MEFs wt con los que experimentaban MEFs con genotipo Knock out para p19ARF, procedentes de ratones con una delección en el exón 1β del locus INK4a/ARF (Kamijo et al., 1997).

Medimos la tasa de proliferación de cada tipo de MEFs infectados bien con vector vacío pLPC, o bien con la construcción retroviral pLPC-AU5-p33ING1, por incorporación de BrdU post-selección. La reducción en la tasa de incorporación de BrdU observada en MEFs wt no se produjo en MEFs ARF $-/-$. Los MEFs doblemente deficientes para p53 y Mdm2 (McMasters et al., 1996) se utilizaron como control. La sobreexpresión de p33ING1 en estos MEFs no supuso reducción en la tasa de proliferación, dato acorde con la necesidad descrita de p53 para los efectos de p33ING1 (Fig. 13a).

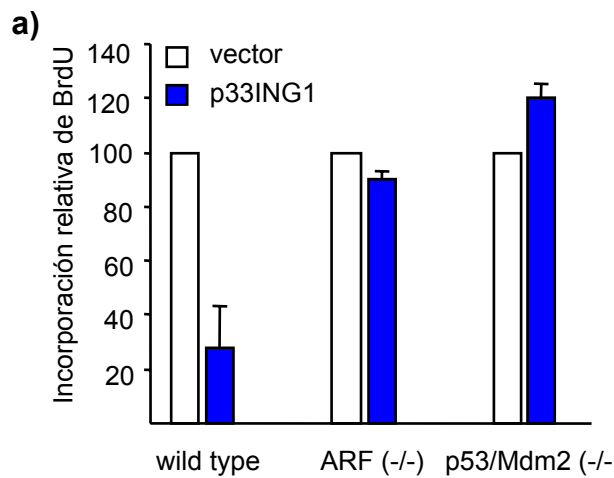
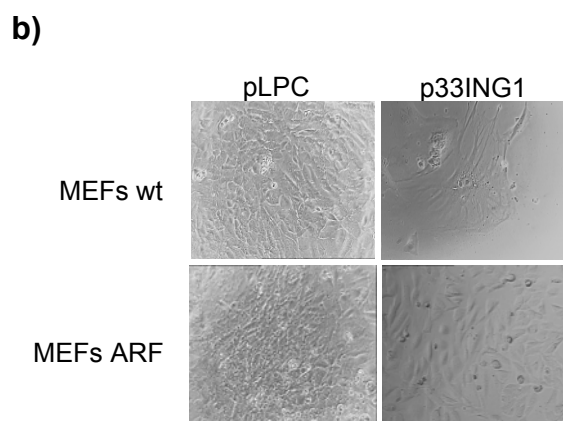


Fig. 13. Tasa de proliferación y morfología de MEFs wt y ARF $-/-$ infectados con p33ING1.

(a) El Porcentaje de células positivas para BrdU se analizó por inmunofluorecencia 72 horas post-infección. Para cada genotipo se dio el valor de 100% a las células infectadas con vector vacío. Los datos son media de tres experimentos independientes. Los MEFs Mdm2/p53 $-/-$ se utilizaron como control negativo de parada del ciclo celular. (b) Morfología de los MEFs wt y ARF $-/-$ infectados con los vectores retrovirales indicados 72 horas post-selección. Aumento 200x.



Además, no se observó el cambio de morfología de los MEFs de genotipos wt en los MEFs ARF^{-/-} infectados con p33ING1 (Fig 13b). De este resultado concluimos que p33ING1 necesita ARF funcional para efectuar parada del ciclo MEFs, y comprobamos que esta parada es dependiente de p53.

Estaba descrito también que la sobreexpresión de p33ING1 provocaba altos niveles de apoptosis en varios tipos celulares (Nagashima et al., 2001; Shinoura et al., 1999), de modo que antes de continuar con el estudio funcional quisimos investigar si se daba este efecto en nuestro sistema de transducción retroviral en los MEFs, para los cuales no se había descrito. Para ello realizamos un ensayo de viabilidad celular por citometría de flujo midiendo incorporación de PI (Ioduro de Propidio) en células no fijadas. Como control positivo de muerte celular en MEFs utilizamos MEFs de genotipo salvaje 48 horas después de ser irradiados con una dosis de 60 J/m² de luz ultravioleta (UVC). No encontramos cifras significativas de muerte celular en los MEFs infectados con p33ING1 tanto de genotipo salvaje como ARF^{-/-} (Fig. 14).

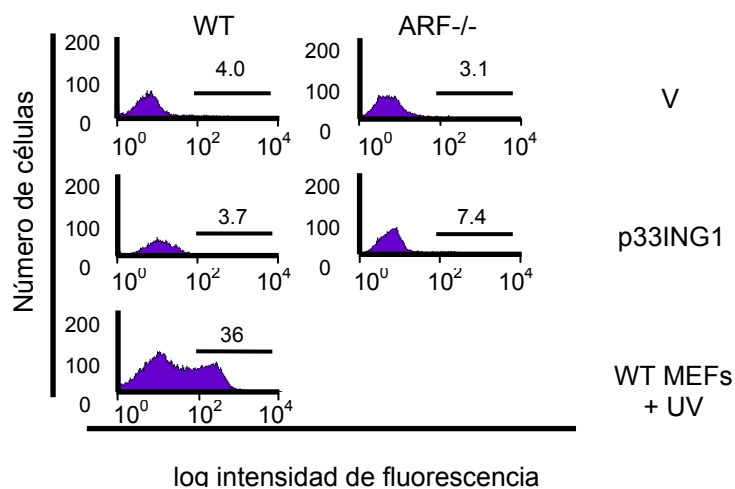


Fig. 14. Viabilidad celular en MEFs infectados con p33ING1. Ensayo de viabilidad celular en MEFs wt y ARF KO infectados con vector vacío o p33ING1, 72 horas post-selección. La incorporación de PI supone no-viabilidad de las células. Como control positivo se incluyen MEFs tratados con una dosis de UV de 60J/m² y procesados 48 horas después.

3. 2. Efecto sobre genes diana de p53

La sobreexpresión de p33ING1 provoca parada del ciclo celular en varios tipos celulares (Nagashima et al., 2001; Shinoura et al., 1999), y según se ha descrito, ésta

parada requiere de p53 funcional.

Una vez comprobado el efecto de p19ARF en esta parada de la proliferación inducida por p33ING1 previamente descrita como p53-dependiente, nos dispusimos a explorar el posible mecanismo (Nagashima et al., 2001). Se ha descrito que p33ING1 es capaz de controlar la estabilidad de p53, posiblemente compitiendo con Mdm2 para evitar que éste lo degrade (Leung et al., 2002). ARF también es un conocido modulador de la estabilidad de p53, por eso quisimos ver posibles efectos de la ausencia y presencia de ARF en los niveles de p53. El análisis por Western Blot mostró un modesto pero reproducible aumento de p53 en los MEFs wt infectados con p33ING1 tanto como en MEFs ARF $-/-$, resultado que nos indicaba que p33ING1 favorece la acumulación de p53 tanto en presencia como en ausencia de ARF (Fig 15a).

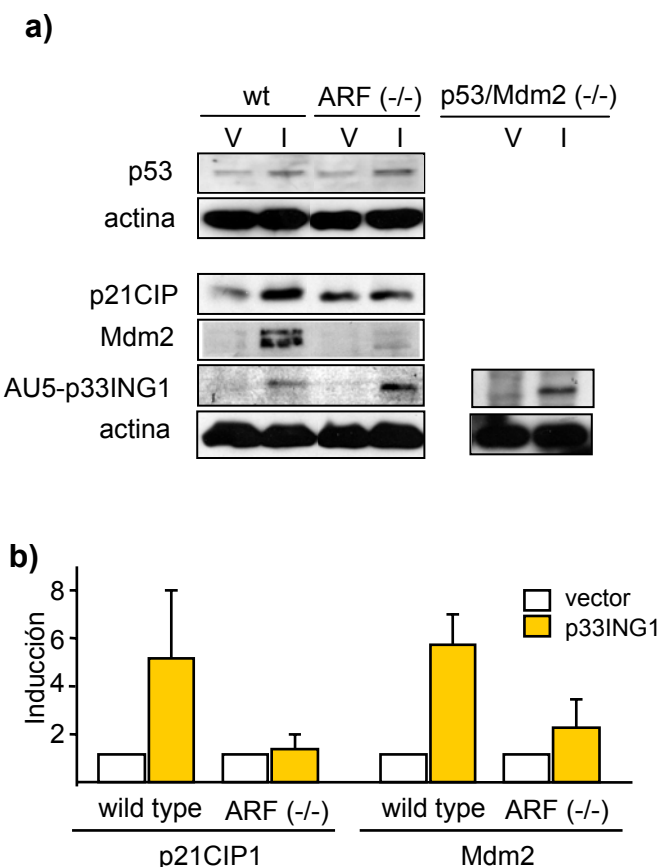


Fig. 15. (a) Análisis por Western Blot de los niveles de p53, Mdm2, p21CIP1 y AU5-p33ING1 en MEFs de los genotipos indicados, infectados con vector vacío (V) o pLPCAU5p33ING1 (I). (b) Cuantificación de la inducción de p21CIP1 y Mdm2 de cuatro experimentos independientes normalizada en cada caso con el control de actina.

La sobreexpresión de p33ING1 induce la expresión de genes diana de p53, de manera dependiente de p53. Analizamos por Western Blot en los MEFs de genotipo salvaje y en los ARF $-/-$ infectados con p33ING1 los niveles de dos genes diana de p53:

p21CIP1 y Mdm2 (Fig. 15a.). Para ambos se ha descrito que su expresión puede ser modulada por p33ING1 (Shimada et al.2002). En los MEFs wt se observaba aumento de ambas proteínas en MEFs infectados con p33ING1 con respecto al vector vacío, más marcado para Mdm2 que para p21. No así en los ARF $-/-$, donde se observaba un pequeño aumento con respecto al vector vacío, pero la inducción se veía bastante reducida (Figs. 15a y b). Estos resultados sugieren que p19ARF no es necesario para la acumulación de p53 por p33ING1 pero sí para la transactivación de estos genes diana de p53.

3. 3. Efectos de los mutantes de delección de p33ING1.

Una vez obtenidos estos resultados, decidimos extender nuestra investigación a los mutantes de delección de p33ING1, para analizar su comportamiento en relación con la proteína completa en estos ensayos (Fig. 16).

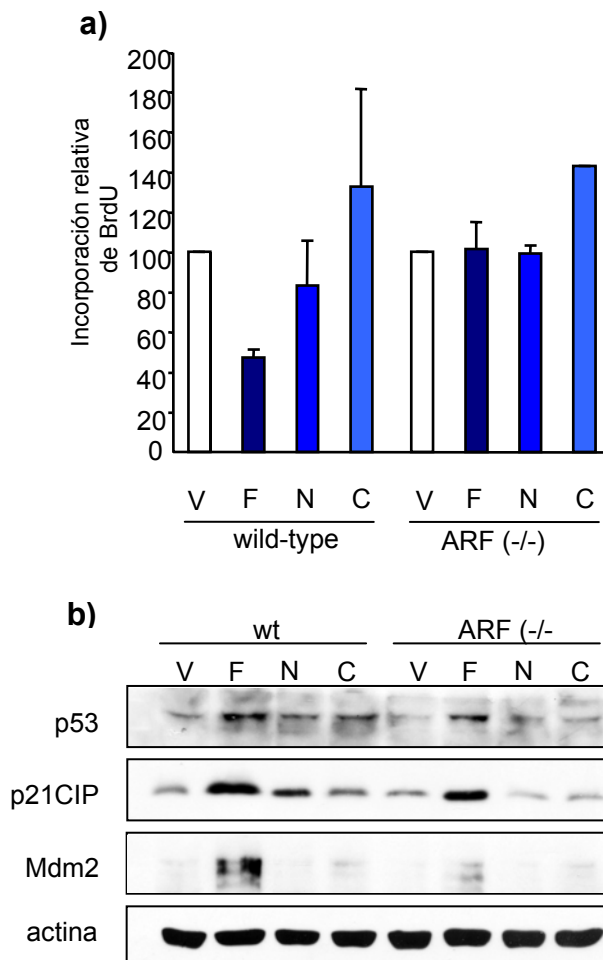


Fig. 16. (a) MEFs de genotipo salvaje y ARF $-/-$ fueron infectados con vectores que codifican para la proteína completa p33ING1 (F), para las delecciones que cubren el extremo N-Terminal y C-Terminal de ING1, p33ING1-N (N, aa 1-171) y p33ING1-C (C, aa 172-279) y vector vacío (V). Se muestra como medida de la tasa de proliferación la incorporación relativa de BrdU, medida tras un pulso de 6 horas. (b) Análisis por Western Blot de los niveles de p53, p21CIP1 y Mdm2 en los MEFs infectados que se describen en a.

4. ANÁLISIS DE LA LÍNEA CELULAR EMG CON EXPRESIÓN INDUCIBLE DE p33ING1 y p14ARF.

Para profundizar en el estudio de la conexión funcional entre p14ARF y p33ING1 se generó en el laboratorio una línea celular doblemente inducible para ambas proteínas. Esta línea se construyó a partir de otra ya generada en el laboratorio del Dr. Gordon Peters (Cancer Research UK, Londres), la línea NARF2 (Stott et al., 1998), procedente de células U2OS de osteosarcoma humano que no expresan ARF posiblemente por metilación (Park et al., 2002). Las células NARF2 tienen integrado un promotor inducible por IPTG que activa la transcripción de p14ARF (ver Materiales y Métodos).

4.1. Generación de la línea celular inducible EMG.

Sobre la línea celular NARF2 se integró un sistema que permite la expresión inducible de la proteína p33ING1 con el tag AU5 tras la adición de doxiciclina. De este modo, disponíamos de un modelo de estudio de células humanas, en el que podíamos manipular los niveles de ambas proteínas independientemente y así observar las posibles conexiones entre ambas.

Durante la generación de esta línea, obtuvimos varios clones estables, que se muestran en la figura 17. De entre ellos escogimos el clon 6a, este clon tenía una expresión residual detectable de AU5-p33ING1 en ausencia de doxiciclina, pero en comparación con los demás era el que mayor inducción mostraba en presencia del antibiótico.

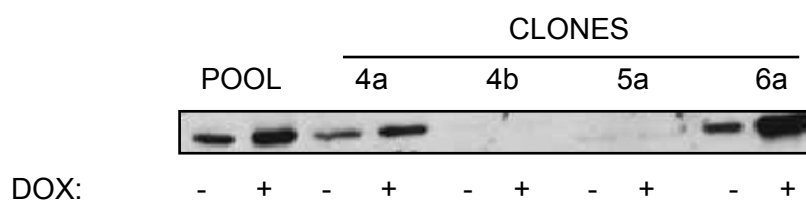


Fig. 17. Comprobación de clones obtenidos durante la generación de la línea inducible EMG. Se muestra Western Blot con un anticuerpo anti-AU5 de los extractos de un pool y de cuatro clones estables obtenidos en presencia y ausencia de doxiciclina (2,5µg/ml) tras 24 horas de inducción.

Se realizaron experimentos de puesta a punto con el clon 6a para testar la concentración óptima de doxiciclina y el tiempo de exposición de las células al antibiótico, y saber así con exactitud ajustar estos dos parámetros a la hora de obtener la inducción máxima de p33ING1 (Figs. 18a y b).



Fig. 18. Puesta a punto del tiempo y la concentración de doxiciclina para la inducción máxima del clon 6a de las EMG. (a) Western Blot con un anticuerpo anti-AU5 de extractos del clon estable 6a y una concentración de 2,5 µg/ml a distintos tiempos de exposición a doxiciclina. (b) Western Blot de extractos del clon estable 6a con distintas concentraciones de doxiciclina, a 24 horas de inducción.

A partir de este momento utilizamos para nuestros experimentos el clon estable 6a que denominaremos a partir de ahora línea EMG. Realizamos un Western Blot con extractos totales de células EMG en las que se habían realizado las cuatro combinaciones posibles de inducción, en el tiempo de máxima expresión de las proteínas, 24 horas. Con éste primer experimento pretendíamos caracterizar las células y conocer cómo se comportaban p14ARF y p33ING1 (Fig. 19).

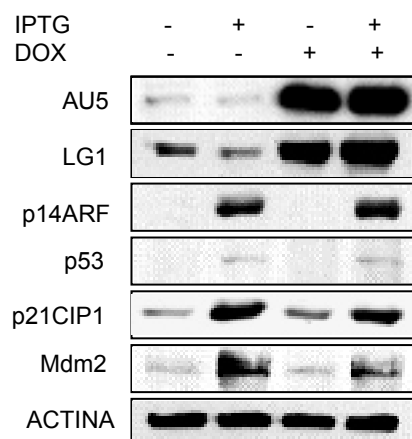


Fig. 19. Caracterización de la línea inducible EMG. Se muestra Western Blot de las proteínas indicadas, en ausencia de inductores (-) y en presencia de: IPTG (1mM), doxiciclina (2,5 µg/ml) o ambos. Se utilizó un anticuerpo anti-AU5 para detectar p33ING1 ectópico y el anticuerpo LG1 para p33ING1 ectópico y endógeno.

Como se puede observar en la figura, en ausencia de ambos inductores no hay expresión detectable de p14ARF y sin embargo sí hay expresión residual de AU5-p33ING1 que se suma al p33ING1 endógeno que estas células tienen. Los niveles basales de Mdm2 y p21CIP1 son bajos, y p53 es indetectable.

En presencia de IPTG, la inducción de ARF es muy intensa, acompañada de un claro aumento en p53, y en sus dianas transcripcionales Mdm2 y p21CIP1, como estaba descrito (Stott et al., 1998).

En presencia de doxiciclina, se observa un considerable aumento de p33ING1. La inducción de p33ING1 en ausencia de p14ARF en este sistema no se traduce en acumulación detectable de p53 o Mdm2, sin embargo p21 sí experimenta una pequeña inducción con respecto al control sin inducir.

En presencia de ambos inductores, observamos un efecto de acumulación de p53, Mdm2 y p21 similar al de las células EMG inducidas sólo con IPTG. Parece que el efecto de p14ARF sobreexpresado es tal que nos impide ver cualquier efecto de cooperación de p33ING1 con p14ARF en estas células.

Dado que en nuestro primer experimento todas las inducciones eran máximas, analizamos las cinéticas de inducción de p33ING1, p14ARF, p53 y sus dianas transcripcionales Mdm2 y p21 en las diferentes condiciones de inducción (Figs. 21a-d).

En estos experimentos observamos que con inducción de p14ARF constante máxima, tanto los niveles de p53 como sus dianas Mdm2 y p21 están elevados, independientemente de que p33ING1 esté inducido o no, o en que medida lo esté (Fig. 21a). Cuando, al contrario, tenemos inducción constante máxima de p33ING1, aumentamos paulatinamente la inducción de p14ARF, y observamos de nuevo que en ausencia de p14ARF no hay efecto obvio de p33ING1 sobre p53 o Mdm2, y un efecto pequeño pero reproducible sobre p21CIP1 (Fig. 21b). Los controles con sólo una de ellas inducida en los intervalos de tiempo indicados confirman este dato (Figs. 21c y d).

Estos resultados indican que en este modelo no se observan efectos de p33ING1 en acumulación de p53 y Mdm2, al menos a nivel de proteína, en ausencia de p14ARF. p21CIP1 sí experimenta una pequeña acumulación en presencia de p33ING1 inducido. Los efectos de la fuerte sobreexpresión de p14ARF en la línea celular inducible EMG no nos permiten ver efectos de p33ING1 cuando ambas proteínas se encuentran inducidas a la vez.

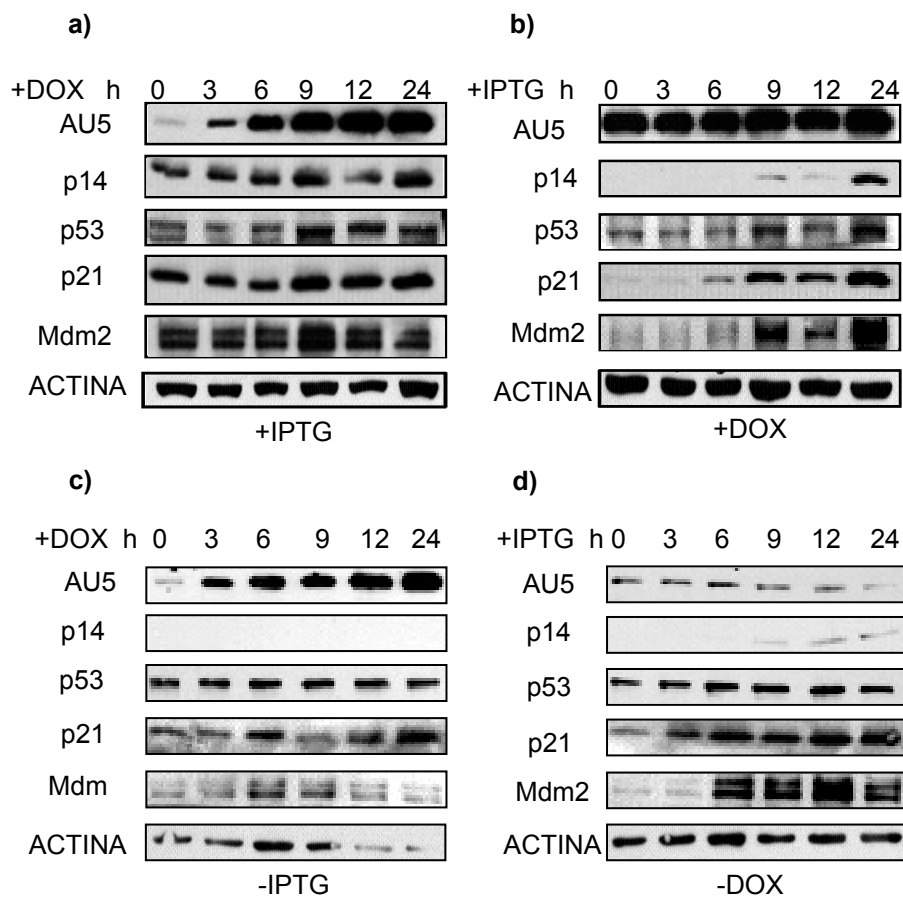


Fig. 20. Western Blot de Mdm2, p53, AU5-p33ING1, p21 y p14ARF.

(a) Inducción máxima de p14ARF, 24 horas con IPTG seguida de inducción de AU5-p33ING1 con doxiciclina durante los tiempos indicados. (b) Inducción máxima de AU5-p33ING1, 24 horas con doxiciclina seguida de inducción de p14ARF con IPTG durante los tiempos indicados. (c) Inducción sólo con doxiciclina durante los tiempos indicados. (d) Inducción sólo con IPTG en los tiempos indicados.

4. 2. Análisis de proliferación en la línea celular EMG.

Para observar los efectos funcionales de las inducciones de p33ING1 y p14ARF independientemente o combinadas a otros niveles, realizamos una serie de experimentos. El primer experimento que planteamos fue el análisis del efecto de las inducciones de p33ING1 y p14ARF sobre el ciclo celular mediante citometría de flujo, a las 24 horas de inducción en todas las condiciones (Fig. 21). El análisis de los datos mostró que el porcentaje de células en fase S (síntesis de ADN) tras inducción máxima de p14ARF experimentaba una importante reducción con respecto al control sin inducir,

mostró que el porcentaje de células en fase S (síntesis de ADN) tras inducción máxima de p14ARF experimentaba una importante reducción con respecto al control sin inducir, y aumentaba el porcentaje de células en G₂/M (similar a lo descrito en (Stott et al., 1998)). Sin embargo la inducción de p33ING1 en ausencia de p14ARF, no provocó cambios significativos en la distribución del ciclo celular con respecto al control. Al combinar las dos inducciones, el efecto es similar al de la inducción de p14ARF en solitario. Los porcentajes de las células EMG en cada fase del ciclo se muestran en la tabla 1.

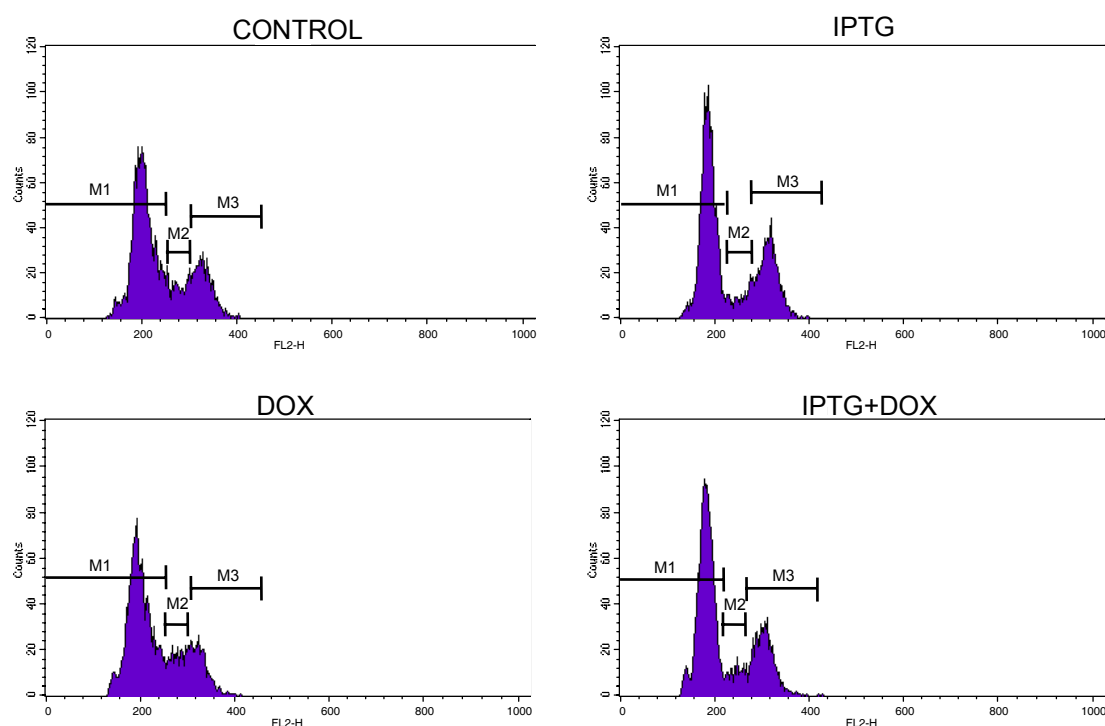


Fig. 21. Perfil de ciclo celular de las células EMG por citometría de flujo tras 24 horas de inducción. Se muestran perfiles significativos de las cuatro combinaciones de inducción.

		S	G₂/M
CONTROL	65,22 ± 2,91	13,77 ± 0,10	22,14 ± 1,79
IPTG	64,24 ± 6,01	5,71 ± 1,69	30,48 ± 4,68
DOX	63,54 ± 5,19	13,97 ± 1,30	23,16 ± 4,11
IPTG+DOX	66,96 ± 3,33	6,55 ± 0,91	26,7 ± 4,11

Tabla 1. Porcentajes de células EMG por fase del ciclo celular. Se muestran porcentajes de las células EMG en las cuatro condiciones de inducción. Se muestra la media y desviación estándar de tres experimentos.

De estos resultados concluimos que p33ING1 no tiene efectos en la distribución del ciclo celular en ausencia de p14ARF, mientras éste último ejerce una importante reducción de la fase S, independiente de la presencia de p33ING1.

Decidimos medir en las células EMG también por incorporación de BrdU las proporciones de fase S. La inducción de p14ARF provocó en todos los casos una clara reducción de la incorporación de BrdU en coincidencia con los datos del FACs (37% en ausencia de p33ING1 y 24% en presencia de ambas), mientras que la inducción de p33ING1 no tuvo efecto (Fig. 22).

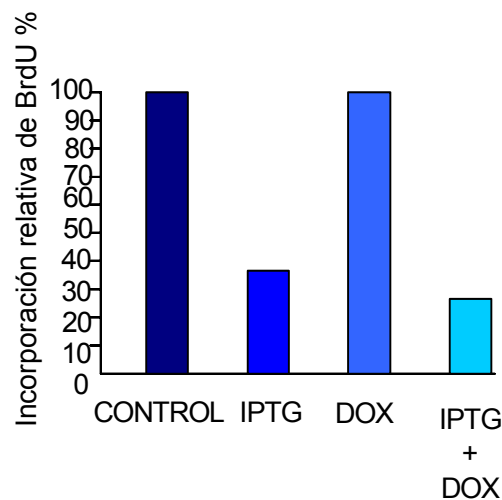


Fig. 22. Incorporación relativa de BrdU en la línea celular EMG. Se muestra la incorporación relativa al control en todas las condiciones de inducción analizadas por inmunofluorescencia. Al menos 300 células se contaron por cada punto.

Durante nuestros experimentos, observamos que con tiempos de inducción de p14ARF mayores a 48 horas se empezaba a observar muerte celular (datos no mostrados). Para analizar en detalle este hecho estudiamos el comportamiento de las células EMG en todas las condiciones de inducción tras 72 horas de crecimiento en presencia de los inductores. El perfil del ciclo celular se mantuvo en las proporciones observadas a 24 horas, y el porcentaje de células en Sub G0-G1 mostró que la sobreexpresión de ARF por sí solo, además de reducir drásticamente la fase S, producía una importante tasa de muerte celular. La inducción de p33ING1 en solitario no tuvo un efecto significativo en viabilidad, pero la inducción conjunta de p14ARF y p33ING1 tuvo un efecto sinérgico, provocando altos niveles de muerte celular. Los porcentajes de células EMG en cada fase se muestran en la tabla 2.

	SUB G		S	G ₂ -M
CONTROL	11,05 ± 5,93	58,19 ± 10,01	9,49 ± 1,74	18,61 ± 1,55
IPTG	33,35 ± 4,86	56,37 ± 1,73	3,7 ± 1,56	6,09 ± 1,35
DOX	13,58 ± 1,72	59,49 ± 1,36	9,36 ± 1,92	15,36 ± 1,83
IPTG+DOX	61,65 ± 2,85	26,46 ± 3,43	2,83 ± 0,69	5,59 ± 2,07

Tabla 2. Porcentajes de cada fase del ciclo celular de las EMG tras 72 horas de inducción. En las cuatro combinaciones posibles de inducción. Los datos son media de dos experimentos y se indica la desviación estándar entre ellos.

La pérdida de viabilidad se vió acompañada de de un cambio en la morfología de las células que se muestra en la figura 23.

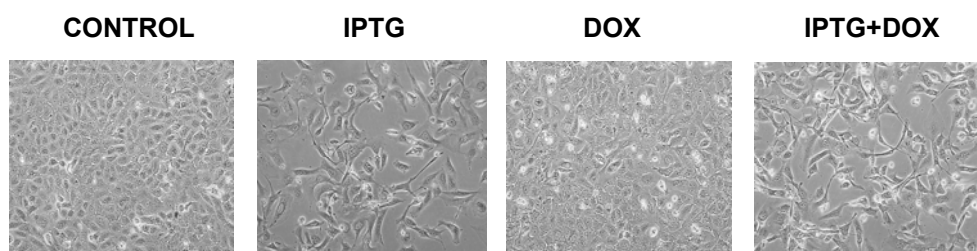


Fig. 23. Morfología de las células EMG a las 72 horas de inducción. Se muestran fotos en todas las condiciones de inducción. Aumento 200x.

Analizamos también el comportamiento de la línea celular EMG en condiciones de crecimiento a baja densidad. La inducción de p14ARF provocó la inhibición prácticamente total del crecimiento celular, ya que no se observó ninguna colonia al final del experimento. La inducción de p33ING1 también tuvo un efecto claro, aunque menor que el de p14ARF. La combinación de ambos tuvo un efecto análogo al de la inducción de p14ARF como en otros ensayos (Fig. 24a). De hecho, tras cuatro días de inducción se observaba un cambio morfológico muy marcado (células alargadas) en las células inducidas con IPTG y al final del experimento a los diez días, no se observó prácticamente ninguna célula viable en las placas inducidas con IPTG (con o sin doxiciclina) (Fig. 25).

Los controles con las líneas parentales NARF2 y U2OS, al tener un crecimiento normal en todas las condiciones, descartaban efectos inespecíficos o de toxicidad que pudieran tener la presencia de las drogas inductoras (Figs. 24b y c). Estos resultados nos indicaban que p33ING1 por sí solo ejerce un efecto sobre la capacidad de formación de colonias de las células EMG cuando se encuentra inducido en ausencia de p14ARF, pero en su presencia el efecto que p33ING1 tiene se encuentra oscurecido de igual modo que en los otros ensayos realizados an la línea EMG.

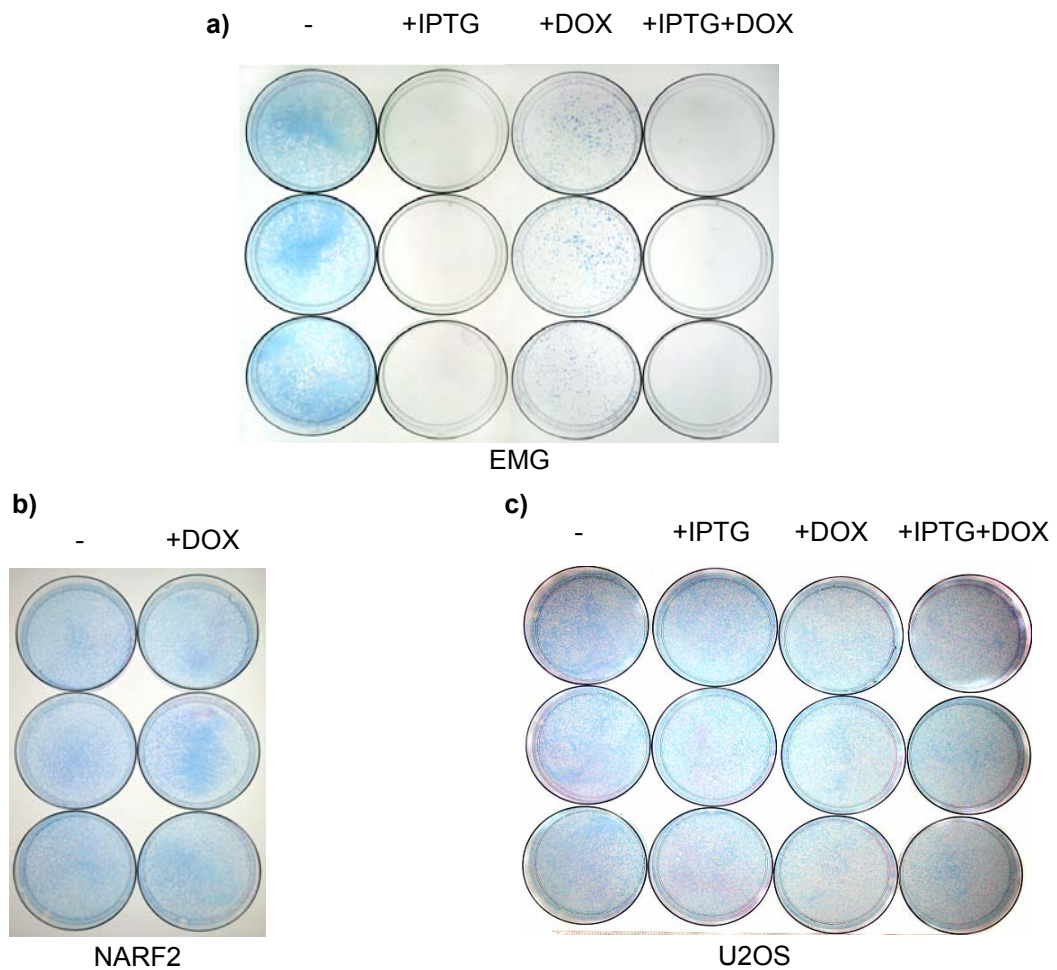


Fig. 24. Ensayo con células EMG a baja densidad. (a) De izquierda a derecha se muestra en ausencia de ambos inductores, en presencia de IPTG, en presencia de doxiciiclina y en presencia de ambos. (b) NARF2 como control en presencia y ausencia de doxiciiclina. (c) Las células parentales, U2OS, como control en todas las condiciones de inducción. Se muestran triplicados en todos los casos. Las fotografías se hicieron tras teñir con Giemsa 10 días después de plaqurear 5×10^4 células/p100.

La morfología de las células antes de ser fijadas para el experimento anterior se muestra en la figura 25.

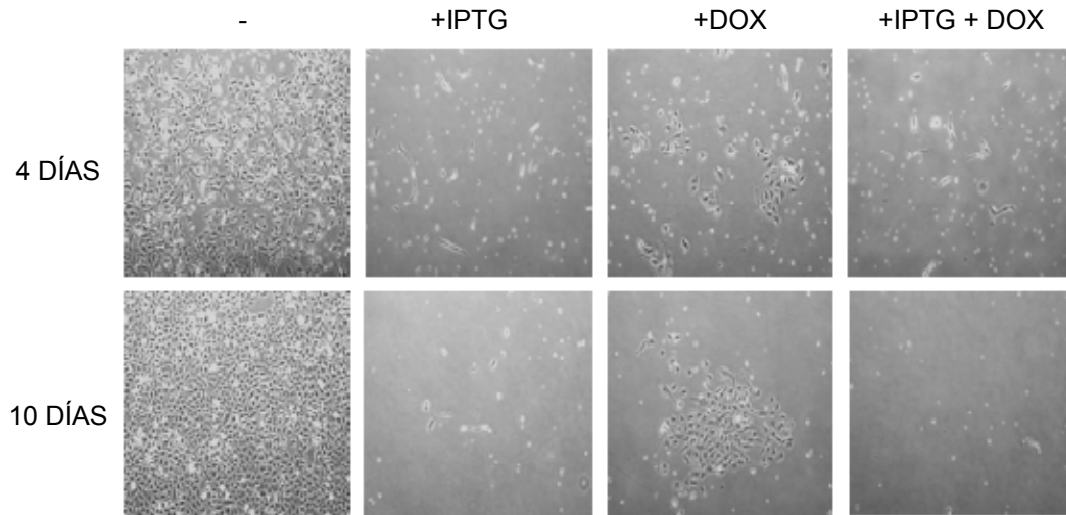


Fig. 25. Morfología de las células EMG a baja densidad. Aumento 100x.

4. 3. Efectos en estabilidad.

Experimentos previos, con células transfectadas transitoriamente, sugerían que podía existir una correlación inversa entre los niveles de p33ING1 y p14ARF. Dado que ARF regula la estabilidad de otras proteínas con las que interacciona, y se ha sugerido un papel de p33ING1 en estabilización de p53, decidimos usar la línea celular EMG para estudiar posibles efectos en la estabilidad de ambas proteínas. Analizamos los niveles de proteína de p14ARF y p33ING1 tras la retirada del agente inductor específico, en presencia o ausencia de la otra proteína. Analizamos los niveles de p14ARF tras la retirada de IPTG del medio (tras 24 horas de inducción) en presencia o ausencia de la inducción máxima de p33ING1. Se eligió medir a partir de las 24 horas de retirar el IPTG puesto que datos anteriores nos indicaron que 24 horas después de retirarlo los niveles de la proteína p14ARF ectópica no variaban (datos no mostrados) (Fig. 26a y b). Para estudiar si p14ARF podía influir en la estabilidad de p33ING1, realizamos el ensayo inverso. En este caso, recogimos extractos a partir del momento de retirar la doxiciplina, tras 24 horas de crecimiento en presencia del inductor, en presencia y ausencia de la inducción máxima de p14ARF (Fig. 26c y d).

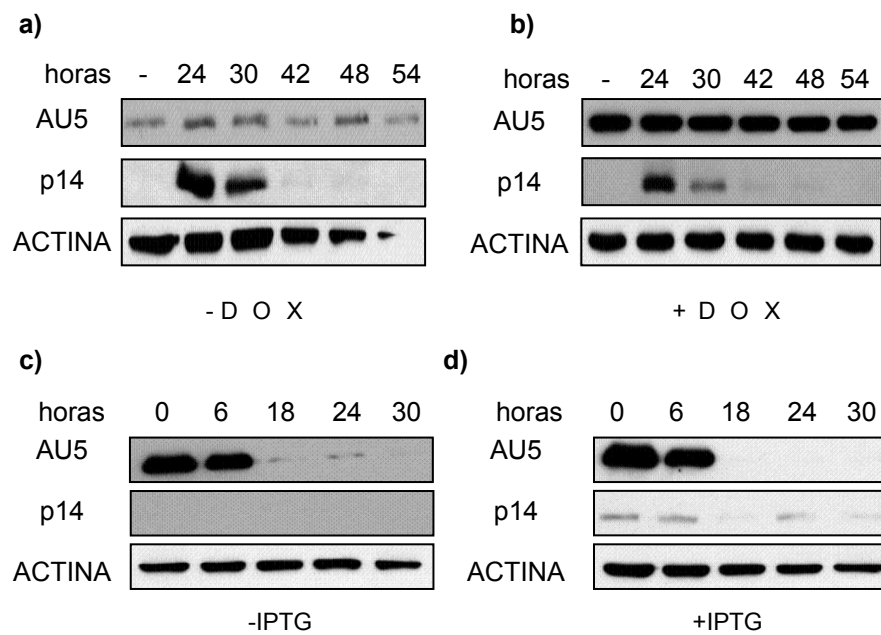


Fig. 26. Estabilidad de p14ARF y p33ING1 a partir de 24 horas de la retirada de sus inductores. Los niveles de cada proteína se analizaron por Western Blot con anticuerpos anti-p14ARF o anti-AU5. **(a)** En presencia de la inducción máxima de AU5-p33ING1 con doxiciclina. **(b)** En ausencia de AU5-p33ING1. **(c)** En presencia de la inducción máxima de p14ARF con IPTG. **(d)** En ausencia de p14ARF.

Como podemos observar en la figura, el nivel estacionario de p14ARF disminuye con cinética similar en presencia o ausencia de inducción de AU5-p33ING1, de modo que la estabilidad de p14ARF no parece estar afectada por p33ING1 en este modelo. Observamos también que la ausencia o presencia de p14ARF no influyen en la estabilidad de la proteína p33ING1, así que podríamos concluir que, al menos en este modelo, p14ARF y p33ING1 no se influyen mutuamente a nivel de estabilidad, y también que AU5-p33ING1 es mucho más sensible a la retirada de su inductor que p14ARF.

4. 4. Análisis de la estabilidad de p53.

Ya que ARF y p33ING1 se han implicado en regulación de la estabilidad de p53, decidimos analizar posible cooperación a este nivel en nuestro sistema inducible, y en

las células NARF2 de las que provienen, mediante ensayos de estabilidad tras adición de cicloheximida (20 μ M), droga que inhibe la traducción, en el medio de cultivo. Este experimento se realizó en presencia y ausencia de los inductores.

En el caso de las células NARF2, en presencia y ausencia de IPTG, observamos que p53 se estabiliza tras la inducción de p14ARF con IPTG como era esperable (Fig. 27a).

En las células EMG, realizamos el ensayo de adición de cicloheximida en ausencia de las dos inducciones, en presencia de la inducción máxima de p33ING1 y en presencia de la inducción máxima de p33ING y p14ARF. El control negativo de inducción mostró un resultado similar al de las células NARF2 sin inducir (vida media de menos de 2 horas). La inducción de p33ING1 no provocó estabilización de p53, y la inducción de p33ING1 y p14ARF mostró un resultado similar al de la estabilización de p53 por p14ARF en las células NARF2 o EMG (vida media de alrededor de 4 horas). (Fig. 27b). Por tanto, en este modelo, la sobreexpresión de p33ING1 no afecta a la vida media de p53. Sin embargo p14ARF provocó un claro aumento de estabilidad de p53 pero no se observa cooperación con p33ING1 cuando se inducen ambas proteínas a la vez.

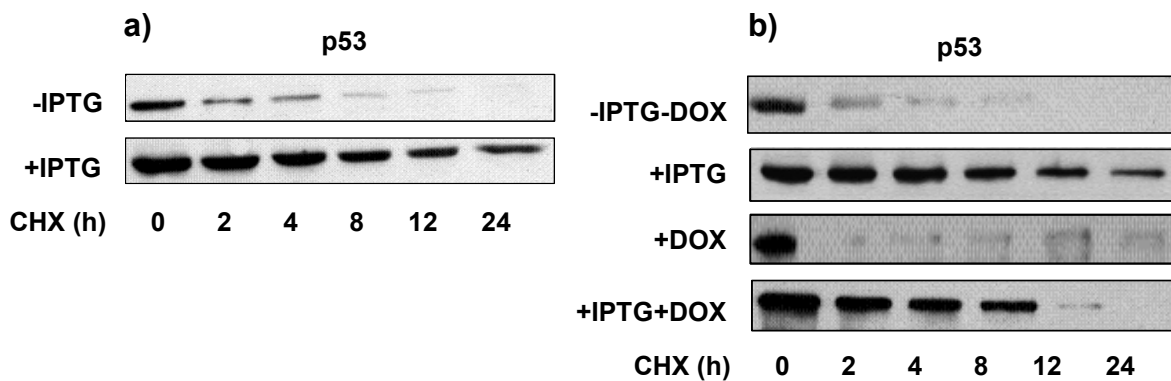


Fig. 27. Ensayo de estabilidad de p53 en células EMG y NARF2. (a) Estabilidad de p53 en células NARF2 en presencia y ausencia de IPTG. (b) Estabilidad de p53 en células EMG en todas las condiciones de inducción. **CHX:** cicloheximida.

6. DISCUSIÓN

Las proteínas ARF y p33ING1 están implicadas en mecanismos de supresión tumoral y están relacionadas con la vía de p53. Durante el desarrollo de este trabajo hemos obtenido evidencias de que ARF y p33ING1 están conectadas *in vivo*, tanto física como funcionalmente.

La función de ARF mejor caracterizada es la regulación de los niveles de p53 vía Mdm2, pero ciertas evidencias demuestran que ARF podía tener otras funciones independientes de p53 o Mdm2 que podrían implicar interacción con otras proteínas. Al inicio de este trabajo ya se habían descrito funciones de ARF independientes de p53 y Mdm2, la interacción con B23 retardando el procesamiento de los ARN ribosómicos (Sharpless, 2005) o el papel de ARF en regulación transcripcional independiente de p53 y evidencias genéticas del papel de ARF como supresor tumoral de forma independiente de p53 en modelos animales (ver Introducción).

La proteína p33ING1 se conocía como posible supresor tumoral al inicio de este trabajo, y estaba descrita su capacidad de parar el ciclo celular en G1, su papel favoreciendo procesos de reparación de daño a ADN, su influencia en procesos de senescencia, y además su conexión a nivel funcional con la vía de p53 (Russell et al., 2006; Shi and Gozani, 2005). p33ING1 se había implicado como cofactor de p53 en activación-represión transcripcional a través de procesos de remodelación de cromatina (Feng et al., 2002; Kuzmichev et al., 2002; Russell et al., 2006), además de regular la modificación postraducciona l de p53 por acetilación (Feng et al., 2002; Kataoka et al., 2003) y regular la estabilidad de p53 compitiendo con Mdm2 (Leung et al., 2002).

Con estas premisas, y dado que ARF y p33ING1 actúan a niveles solapantes en lo que a p53 se refiere, nos planteamos la hipótesis de que existiera una conexión funcional entre ellas. Además, el estudio de la posible asociación, tanto física como funcional, podría llevarnos a conocer más datos sobre la función de p33ING1, e identificar posibles nuevas funciones de ARF independientes de p53 y Mdm2.

Para estudiar la asociación física entre ambas proteínas, hemos realizado experimentos de inmunoprecipitación, que han mostrado su presencia en el mismo inmunocomplejo. Hemos podido demostrar la asociación de ARF con p33ING1 de manera específica, tanto entre las proteínas ectópicas, como con las endógenas. Las

técnicas utilizadas nos permiten decir que ambas están en un mismo complejo, pero no podemos distinguir si se trata o no de una interacción directa entre ambas proteínas. Cuando sobreexpresamos ambas proteínas en células 293T, vemos que el anticuerpo anti-p14ARF es mucho más eficiente inmunoprecipitando p33ING1 que al contrario. Estas observaciones las corroboramos en el experimento con proteínas endógenas, ya que sólo hemos sido capaces de detectar la asociación inmunoprecipitando con anti-p14ARF, y no con el suero LG1 (contra el extremo C-terminal de p33ING1). Un resultado similar se obtuvo con el estudio de la interacción física con los mutantes de delección de p33ING1, en ningún caso observamos inmunoprecipitación de p14ARF con el anticuerpo anti-AU5. Una posible interpretación de estos resultados sería que sólo una fracción de p33ING1 interactúa con p14ARF, aunque no podemos descartar que se deba a la distinta afinidad de los anticuerpos, o a una incompatibilidad estructural entre p14ARF y p33ING1 unido a sus anticuerpos y que así se pueda inhibir la interacción.

En cuanto a los experimentos de localización, basándonos en nuestros resultados, parece evidente que ARF favorece la acumulación de p33ING1 en el nucleolo, como sucede con otras proteínas con las que ARF interactúa, como por ejemplo Mdm2 (Sherr and Weber, 2000). Tanto sobreexpresando ambas proteínas por co-transfección, como induciendo p19ARF endógeno mediante infección retroviral con RasV12 y posterior transfección con la proteína p33ING1 hemos visto la acumulación de p33ING1 en el nucleolo. Hemos descartado que este efecto sea dependiente de p53 y Mdm2 utilizando los MEFs doble deficientes p53/Mdm2, y que sea consecuencia de cambios en el ciclo celular. Aunque estos datos mostraban que ARF es capaz de favorecer la acumulación de p33ING1 en el nucleolo, la interacción con ARF no es un requisito indispensable para la localización de p33ING1 en el nucleolo. No hemos observado a p33ING1 totalmente excluido del nucleolo pues se expresa uniformemente por el núcleo, incluso en ausencia de ARF. p33ING1 contiene posibles secuencias de localización nucleolar, de modo que la interacción con ARF podría favorecer la funcionalidad de estas secuencias, como está descrito para Mdm2 (Lohrum et al., 2000). No tenemos evidencias de que la acumulación de p33ING1 en nucleolo sea importante para su función. Otros autores han descrito también una acumulación de p33ING1 en el

nucleolo tras exposición a luz UV, y correlación entre su localización nucleolar y capacidad de inducir apoptosis (Cheung et al., 2001; Scott et al., 2001a).

Al realizar el estudio de localización con los mutantes de delección de p33ING1 observamos que no hay correlación entre su capacidad de interactuar con p14ARF y su relocalización en presencia de ARF. Ya que el extremo N-terminal de p33ING1 es suficiente para la interacción con ARF, sería esperable que esta delección se relocalizase al nucleolo del mismo modo que la proteína completa, y nuestros resultados no muestran esa relocalización. Experimentos de inmunofluorescencia de ambas delecciones, sin coexpresar ARF, mostraron que su localización no era exclusivamente nuclear. Al analizar la secuencia aminoacídica, pudimos observar que este efecto se puede deber a que ninguna de las dos delecciones contiene una NLS completa. Esta región incluye varias posibles NLS, la región que abarca la delección N-terminal, hasta el aminoácido 171, contiene una de las tres secuencias de aminoácidos básicos (SKRSRRQR, en el aminoácido 141) que podrían ser posibles secuencias de localización nuclear, mientras que la delección C-terminal, del aminoácido 172 al 279 abarca otras dos secuencias. La delección C-terminal, además de no localizar estrictamente en núcleo, sino también por el citoplasma, parece excluirse del nucleolo en un alto porcentaje de las células que lo sobreexpresan. Este defecto en localización podría explicar también la baja eficiencia de coprecipitación con ARF de la delección N-terminal. Por tanto, hipotetizamos que el hecho de que la localización de las delecciones no es únicamente nuclear como en el caso de la proteína completa, dificulta la interacción con ARF y acumulación en nucleolo de la delección N-terminal de p33ING1.

ARF es un importante regulador de p53. ARF produce acumulación de p53 a través de su interacción con Mdm2 evitando que éste degrade a p53 por la vía del proteasoma (Sherr, 2001a) y coopera con p53 en regulación transcripcional (ver Introducción).

En nuestro modelo de MEFs la sobreexpresión de p33ING1 ejerce un efecto pequeño pero reproducible en los niveles de p53, efecto que se da de igual modo en los MEFs ARF $-/-$. Este hecho sugiere que ARF es dispensable para la estabilización de p53 vía p33ING1. Este modelo estaría de acuerdo con el que sugiere competición de

Mdm2 y p33ING1 por el sitio de unión a p53, según el cual p33ING1 velaría por la estabilidad de p53 salvaguardándolo de la degradación vía proteasoma provocada por Mdm2, y éste proceso sería independiente de ARF (Leung et al., 2002). Curiosamente, no hemos sido capaces de observar un efecto similar de la sobreexpresión de ING1 en estabilización de p53 en nuestro sistema inducible. Mientras que la inducción de p14ARF con IPTG en este sistema aumenta la vida media de p53, como está descrito (Stott, 1998), la inducción de p33ING1 en ausencia de p14ARF no provocó cambios evidentes en la estabilidad de p53. Ubiquitin-ligasas diferentes a Mdm2, como ARF-BP1, COP-1 y Pirh2 juegan un importante papel en la degradación de p53 en células U2OS (Chen et al., 2005; Dornan et al., 2004). A diferencia de Mdm2, no se ha descrito conexión de p33ING1 con estas ubiquitin ligasas. Aunque no podemos descartar alteraciones durante la generación de la línea inducible (ver más adelante), se podría especular que el diferente efecto de p33ING1 en estabilización de p53 en los dos sistemas celulares analizados se deba a la importancia en cada caso de las diferentes Ubiquitin ligasas para p53.

La ausencia de ARF funcional tiene un claro efecto en la parada del ciclo celular inducida por p33ING1, pues en ausencia de ARF funcional en los MEFs ARF^{-/-} la parada inducida por p33ING1 en los MEFs wt se ve reducida. De forma similar, no hemos observado efecto de la sobreexpresión de p33ING1 a corto plazo en ausencia de p14ARF en nuestro sistema inducible.

Cuando analizamos la transactivación de dianas de p53 dependiente de p33ING1, en concreto de p21 y Mdm2, hemos comprobado que ésta se encuentra desregulada en ausencia de ARF. Estas evidencias indican que ARF es necesario a nivel de regulación transcripcional y apoyarían un modelo en que p33ING1 coopera con ARF para ejercer sus efectos sobre el ciclo celular y la transactivación de los genes diana de p53, pero que la estabilización de p53 por p33ING1 es ARF independiente.

Se ha sugerido que p33ING1 juega un importante papel en control transcripcional, a través de procesos de remodelación de cromatina. La construcción N-terminal, que es suficiente para la interacción con ARF, incluye la región hipervariable N-terminal y la NCR, región conservada en las proteínas de la familia ING. Toda la región que abarca esta construcción ha sido implicada en interacción con histona acetil

transferasas (HATs) e histona deacetilasas (HDACs) (Feng et al., 2002; Goeman et al., 2005; Kuzmichev et al., 2002; Nourani et al., 2001; Russell et al., 2006; Ruthenburg et al., 2007; Shi and Gozani, 2005; Shi et al., 2006; Skowyra et al., 2001; Vieyra et al., 2002; Xin et al., 2004). Además, en esta construcción está incluido un dominio de silenciamiento transcripcional que ejerce una represión similar a la de la proteína p33ING1 completa (Goeman et al., 2005). En cuanto a ARF, existen múltiples evidencias que indican que, además de su participación en regulación de estabilidad de p53, juega un papel directo en transcripción (Sherr, 2006). Se ha descrito la unión de ARF histona acetil transferasas e histona deacetilasas (Eymin et al., 2006; Leduc et al., 2006) de modo que también la asociación de ARF a esta región de p33ING1 podría apoyar una colaboración entre ARF y p33ING1 a este nivel. También se ha descrito que ARF puede afectar la transactivación mediada por proteínas como HIF1- α , MYC y FOXM1B, así como inhibición de la represión transcripcional mediada por BCL6 (Datta et al., 2004; Fatyol and Szalay, 2001; Suzuki and Wei, 2005). En este sentido, nuestros resultados son coherentes con la hipótesis que sitúa la colaboración de ambos supresores tumorales a nivel transcripcional, dado que vemos un claro efecto de ARF funcional en la transactivación dependiente de p33ING1.

Se ha mostrado que p33ING1 favorece la actividad de construcciones reporteras con secuencias reguladoras de genes diana de p53 como p21CIP1 o Mdm2. Para comprobar si el efecto que hemos observado de ARF se produce a nivel transcripcional, hemos iniciado ensayos de transactivación de promotor por p33ING1 en presencia y ausencia de ARF, así como ensayos de RT-PCR cuantitativa, para analizar los niveles de ARNm de los genes diana estudiados, en presencia de p33ING1, y en presencia o no de ARF funcional. Resultados preliminares sugieren que el aumento en los niveles de ARNm de p21CIP1 en presencia de sobreexpresión de p33ING1, está reducido en células ARF-nulas. También hemos incluido en este estudio Ciclina B1, un gen para el que se ha descrito que su expresión se reprime en presencia de p33ING1 (Takahashi et al., 2004), y nuestros resultados preliminares indican que en los MEFs ARF-/- se perdería este efecto. Esta observación sugiere que la conexión con ARF es relevante tanto para activación como para represión transcripcional por p33ING1.

Durante el estudio de los mutantes de delección, hemos podido observar que aunque nuestras evidencias indican que es el extremo N-terminal de p33ING1 aminoácidos 1 al 171, el que interacciona con ARF, no tiene el mismo efecto que la proteína completa ni en parada del ciclo celular ni en la transactivación p53 dependiente. Otros estudios han identificado la interacción de p33ING1 con otras proteínas, como PCNA, HDAC1, 2, p53, p300 o histonas. Interpretamos que aunque la interacción con ARF parece importante para la función biológica de p33ING1, no es el único factor que condiciona su función y la función normal de p33ING1 implica la relación funcional de p33ING1 con múltiples proteínas. En estos ensayos, el mutante con la región C-terminal tiene un efecto inesperado, pues lejos de efectuar parada en el ciclo de los MEFs, aumenta ligeramente la tasa de crecimiento, tanto en los MEFs wt como en los ARF $-/-$. El mutante C-terminal incluye la región conservada de la familia ING que incluye el dominio PHD. Nuestros datos descartan una interacción con ARF, pero este dominio está implicado en muchas interacciones, como unión a histonas o a fosfolípidos de membrana, de modo que el efecto que provoca en la proliferación de los MEFs podría reflejar un posible efecto dominante negativo, independiente de ARF.

Al analizar el comportamiento de las células EMG mediante ensayos de crecimiento a baja densidad o midiendo viabilidad por citometría de flujo, pudimos observar un efecto de p33ING1 sobre viabilidad celular, independiente de p14ARF, que se hace evidente a tiempos largo de inducción. Las células EMG en presencia de inducción de p33ING1 mostraron una capacidad de formación de colonias menor que el control, en ausencia de p14ARF. En presencia de ambas inducciones la tasa de muerte celular aumentó, y la reducción del número de colonias fue más dramático, lo que nos lleva a pensar que p33ING1 y p14ARF puedan tener un efecto sinérgico en inducción de muerte en la línea celular EMG a largo plazo de inducción. Está descrito un efecto pro-apoptótico de la sobreexpresión de p14ARF en células tumorales humanas tanto en presencia como en ausencia de p53, incluidas las células U2OS, parentales de las células EMG (Eymin et al., 2003; Hemmati et al., 2002). También se ha descrito un efecto pro-apoptótico de la sobreexpresión de p33ING1 dependiente de p53 en varias líneas tumorales (Nagashima et al., 2001; Shinoura et al., 1999). Aunque nosotros no hemos observado una inducción significativa de apoptosis por p33ING1 en los MEFs

wt, curiosamente en los MEFs ARF^{-/-} observamos que un pequeño incremento en la tasa de muerte celular en presencia de p33ING1.

En este estudio hemos utilizado dos sistemas celulares para ensayos funcionales: MEFs de genotipo normal o ARF-nulos y la línea celular inducible EMG, con expresión inducible de ARF y p33ING1, generada durante este trabajo. Estos dos sistemas celulares analizados en este trabajo presentan importantes diferencias a varios niveles, que deben tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados. Los MEFs de pase temprano son un modelo de células primarias, más cercano a células normales en el organismo. La línea inducible EMG está basada en una línea tumoral inmortalizada (U2OS) y ha sufrido dos procesos de transfección y selección a partir de las células parentales, de forma que no podemos descartar totalmente que algunos efectos que observamos se puedan deber a mutaciones acumuladas.

También hay que tener en cuenta otros factores como las diferencias de especie, de tipo celular o los niveles de sobreexpresión, o estabilidad de las proteínas ectópicas obtenidos en cada caso. En el caso de las células EMG, todos los datos mostrados corresponden a un único clon, hemos comenzado recientemente con la caracterización de otros clones independientes de células EMG, para validar los resultados obtenidos.

Hemos observado similitudes y diferencias en los resultados obtenidos en las células EMG con respecto a los obtenidos en los MEFs. De forma general, en los casos en los que observamos diferencias entre ambos sistemas, consideramos que los resultados con fibroblastos primarios podrían reflejar mejor la función fisiológica de p33ING1 o ARF, aunque el sistema inducible puede ser una herramienta muy flexible para estudiar la conexión entre las dos proteínas y revelar efectos difíciles de estudiar en los MEFs.

En conclusión, los datos presentados en este trabajo muestran que existe colaboración entre p14ARF y p33ING1 a distintos niveles. Observamos conexión a nivel de parada de ciclo, y en transactivación p53 dependiente, además de posible sinergismo/cooperación a nivel de inducción de muerte celular. Las dos proteínas estudiadas en este trabajo son posibles supresores tumorales conectados con p53, confiamos que el estudio en profundidad de su conexión funcional permita conocer

mejor su actuación como supresores tumorales y las consecuencias de su alteración en tumores.

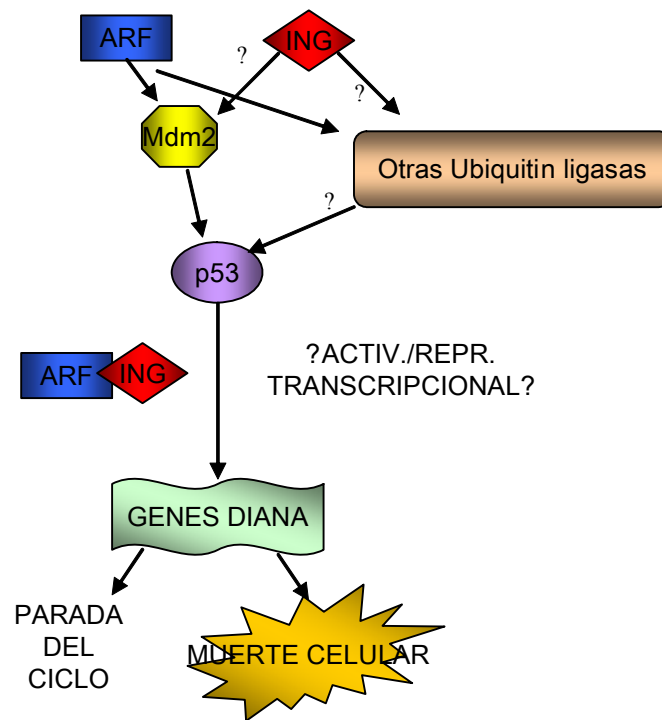


Fig. 1. Modelo de conexión funcional entre ARF y p33ING1.

7. CONCLUSIONES

Tras el estudio realizado durante el desarrollo de este trabajo, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1. p33ING1 interacciona con p14ARF *in vivo*. La región de p33ING1 desde el aminoácido 1 al 171, es suficiente para la interacción con ARF.
2. ARF modula la localización subcelular de p33ING1, favoreciendo su acumulación en el nucleolo. Este efecto es independiente de p53 y Mdm2 y no es consecuencia del efecto antiproliferativo de ARF.
3. La capacidad de p33ING1 de inducir parada del ciclo celular y disparar la transactivación de genes diana de p53 requiere de ARF funcional.
4. ARF es dispensable para la acumulación de p53 dependiente de p33ING1, en fibroblastos primarios de ratón. En la línea celular EMG, p33ING1 no mostró efecto obvio en la estabilización de p53, en presencia o ausencia de ARF.
5. El análisis de las deleciones de p33ING1 sugiere que, además de la conexión con ARF, la función de p33ING1 depende de otros factores como su correcta localización o interacción con otras proteínas
6. Tanto p33ING1 como p14ARF inducen muerte celular de forma independiente en la línea inducible EMG sugiriendo sinergismo a nivel de reducción de la viabilidad celular en este modelo celular.

8. BIBLIOGRAFÍA

Aslanian, A., Iaquina, P. J., Verona, R., and Lees, J. A. (2004). Repression of the ARF tumor suppressor by E2F3 is required for normal cell cycle kinetics. *Genes & Development* *18*, 1413-1422.

Bertwistle, D., Sugimoto, M., and Sherr, C. J. (2004). Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. *Mol Cell Biol* *24*, 985-996.

Bracken, A. P., Kleine-Kohlbrecher, D., Dietrich, N., Pasini, D., Gargiulo, G., Beekman, C., Theilgaard-Monch, K., Minucci, S., Porse, B., Marine, J., *et al.* (2007). The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes & Development* *21*, 525-530.

Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A. H., Schlegelberger, B., Stein, H., Dorken, B., Jenuwein, T., and Schmitt, C. A. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* *436*, 660-665.

Brooks, C. L., and Gu, W. (2006). p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Molecular Cell* *21*, 307-315.

Brummelkamp, T. R., Kortlever, R. M., Lingbeek, M., Trettel, F., MacDonald, M. E., van Lohuizen, M., and Bernards, R. (2001). TBX-3, the gene mutated in ulnar-mammary syndrome, is a negative regulator of p19ARF and inhibits senescence. *J Biol Chem* *276*, 17.

Campisi, J. (2001). Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol* *11*, S27-S31.

Campisi, J. (2005). Suppressing cancer: the importance of being senescent. *Science* *309*, 886-887.

Campos, E. I., Chin, M. Y., Kuo, W. H., and Li, G. (2004). Biological functions of the ING family tumor suppressors. *Cell Mol Life Sci* *61*, 2597-2613.

Clark, P. A., Llanos, S., and Peters, G. (2002). Multiple interacting domains contribute to p14(ARF) mediated inhibition of MDM2. *Oncogene* *21*, 4498-4507.

Coles, A. H., Liang, H., Zhu, Z., Marfella, C. G. A., Kang, J., Imbalzano, A. N., and Jones, S. N. (2007). Deletion of p37^{Ing1} in Mice Reveals a p53-Independent Role for Ing1 in the Suppression of Cell Proliferation, Apoptosis, and Tumorigenesis. *Cancer Research* *67*, 2054-2061.

Colombo, E. e. a. (2005). Nucleophosmin is required for DNA integrity and p19ARF protein stability. *Molecular and Cellular Biology* *25*, 8874-8886.

Chen, D., Kon, M., Li, N., Zhang, W., Qin, J., and Gu, W. (2005). ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. *Cell* *121*, 1071-1083.

Cheung, K. J., Jr., and Li, G. (2002). p33(ING1) enhances UVB-induced apoptosis in melanoma cells. *Exp Cell Res* 279, 291-298.

Cheung, K. J., Jr., Mitchell, D., Lin, P., and Li, G. (2001). The tumor suppressor candidate p33(ING1) mediates repair of UV-damaged DNA. *Cancer Res* 61, 4974-4977.

Datta, A., Nag, A., Pan, W., Hay, N., Gartel, A. L., Colamonici, O., Mori, Y., and Raychaudhuri, P. (2004). Myc-ARF interaction inhibits the functions of Myc. *Journal of Biological Chemistry* 279, 36698-36707.

Datta, A., Nag, A., and Raychaudhuri, P. (2002). Differential regulation of E2F1, DP1, and the E2F1/DP1 complex by ARF. *Molecular and Cellular Biology* 22, 8398-8408.

de Stanchina, E., McCurrach, M. E., Zindy, F., Shieh, S. Y., Ferbeyre, G., Samuelson, A. V., Prives, C., Roussel, M. F., Sherr, C. J., and Lowe, S. W. (1998). E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev* 12, 2434-2442.

Dornan, D., Wetz, I., Shimizu, H., Arnott, D., Frantz, G. D., Dowd, P., Rourke, K. O., Koeppen, H., and Dixit, V. M. (2004). The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. *Nature* 429, 86-92.

DuBridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M., Miller, J. H., and Calos, M. P. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 7, 379-387.

Eymin, B., Claverie, P., Salon, C., Leduc, C., Col, E., Brambilla, E., Khochbin, S., and Gazzerie, S. (2006). p14ARF activates Tip60 dependent and p53 independent ATM/ATR/CHK pathway in response to genotoxic stress. *Molecular and Cellular Biology* 26, 4339-4350.

Eymin, B., Karayan, L., Seite, P., Brambilla, C., Brambilla, E., Larsen, C. J., and Gazzeri, S. (2001). Human ARF binds E2F1 and inhibits its transcriptional activity. *Oncogene* 20, 1033-1041.

Eymin, B., Leduc, C., Coll, J. L., Brambilla, E., and Gazzerie, S. (2003). p14ARF induces G2 arrest and apoptosis independently of p53 leading to regression of tumors established in nude mice. *Oncogene* 22, 1822-1835.

Fatyol, K., and Szalay, A. A. (2001). The p14ARF tumor suppressor protein facilitates nucleolar sequestration of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) and inhibits HIF-1-mediated transcription. *J Biol Chem* 276, 28421-28429.

Feng, X., Hara, Y., and Riabowol, K. (2002). Different HATS of the ING1 gene family. *Trends Cell Biol* 12, 532-538.

Gallagher, S. J., Kefford, R. F., and Rizos, H. (2006). The ARF tumor suppressor. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*.

- Garkavtsev, I., Grigorian, I. A., Ossovskaya, V. S., Chernov, M. V., Chumakov, P. M., and Gudkov, A. V. (1998). The candidate tumour suppressor p33ING1 cooperates with p53 in cell growth control. *Nature* 391, 295-298.
- Garkavtsev, I., Kazarov, A., Gudkov, A., and Riabowol, K. (1996). Suppression of the novel growth inhibitor p33ING1 promotes neoplastic transformation. *Nat Genet* 14, 415-420.
- Garkavtsev, I., and Riabowol, K. (1997). Extension of the replicative life span of human diploid fibroblasts by inhibition of the p33ING1 candidate tumor suppressor. *Mol Cell Biol* 17, 2014-2019.
- Gil, J., Bernard, D., Martinez, D., and Beach, D. (2004). Polycomb CBX7 has a unifying role in cellular lifespan. *Nature Cell Biology* 6, 67-72.
- Gil, J., and Peters, G. (2006). Regulation of the INK4b/ARF/INK4a tumor suppressor locus: all for one or one for all. *Nature Reviews* 7, 667-677.
- Gjerset, R. A. (2006a). DNA damage, p14ARF, Nucleophosmin (NPM/B23), and cancer. *Journal of molecular histology* 37, 239-251.
- Gjerset, R. A. (2006b). Regulation of p14ARF through Subnuclear Compartmentalization. *Cell Cycle* 5, 686-690.
- Goeman, F., Thormeyer, D., Abad, M., Serrano, M., Schmidt, O., Palmero, I., and Baniahmad, A. (2005). Growth inhibition by the tumor suppressor p33ING1 in immortalized and primary cells: involvement of two silencing domains and effect of Ras. *Mol Cell Biol* 25, 422-431.
- Gong, W., Suzuki, K., Russell, M., and Riabowol, K. (2005). Function of the ING family of PHD proteins in cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 1054-1065.
- González, L., Freije, J. M. P., Cal, S., López-Otín, C., Serrano, M., and Palmero, I. (2006). A functional link between the tumor suppressors ARF and p33ING1. *Oncogene* 25, 5173-5179.
- Gonzalez, S., Klatt, P., Delgado, S., Conde, E., Lopez-Rios, F., Sanchez-Cespedes M, Mendez, J., Antequera, F., and Serrano, M. (2006). Oncogenic activity of Cdc6 through repression of the INK4/ARF locus. *Nature* 440, 702-706.
- Gozani, O., Karuman, P., Jones, D. R., Ivanov, D., Cha, J., Lugovskoy, A. A., Baird, C. L., Zhu, H., Field, S. J., Lessnick, S. L., *et al.* (2003). The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell* 114, 99-111.
- Groth, A., Weber, J. D., Willumsen, B. M., Sherr, C. J., and Roussel, M. F. (2000). Oncogenic ras induces p19ARF and growth arrest in mouse embryo fibroblasts lacking p21Cip1 and p27Kip1 without activating cyclin D- dependent kinases [In Process Citation]. *J Biol Chem* 275, 27473-27480.

- Hasan, M. K., Yaguchi, T., Sugihara, T., Kumar, P. K., Taira, K., Reddel, R. R., Kaul, S. C., and Wadhwa, R. (2002). CARF is a novel protein that cooperates with mouse p19ARF (human p14ARF) in activating p53. *J Biol Chem* 277, 37765-37770.
- He, G. H., Helbing, C. C., Wagner, C. W., Sensen, C. W., and Riabowol, K. (2005). Phylogenetic analysis of the ING family of PHD finger proteins. *Molecular Biology Evol* 22, 104-116.
- Hemann, M. T., and Narita, M. (2007). Oncogenes and senescence: breaking down in the fast lane. *Genes & Development* 21, 1-5.
- Hemmati, P. H., Gillisen, B., von Haefen, C., Wendt, J., Stärck, L., Güner, D., Dörken, B., and Daniel, P. T. (2002). Adenovirus-mediated overexpression of p14 ARF induces p53 and Bax-independent apoptosis. *Oncogene* 21, 3149-3161.
- Inoue, K., Roussel, M. F., and Sherr, C. J. (1999). Induction of ARF tumor suppressor gene expression and cell cycle arrest by transcription factor DMP1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3993-3998.
- Itahana, K., Bhat, K. P., Jin, A., Itahana, Y., Hawke, D., Kobayashi, R., and Zhang, Y. (2003). Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Mol Cell* 12, 1151-1164.
- Jacobs, J. J., Keblusek, P., Robanus-Maandag, E., Kristel, P., Lingbeek, M., Nederlof, P. M., van Welsem, T., van De Vijver, M. J., Koh, E. Y., Daley, G. Q., and van Lohuizen, M. (2000). Senescence bypass screen identifies TBX2, which represses *cdkn2a* (p19ARF) and is amplified in a subset of human breast cancers [In Process Citation]. *Nat Genet* 26, 291-299.
- Kalinichenko, V. V., Major, M. L., Wang, X., Petrovic, V., Kuechle, J., Yoder, H. M., Dennewitz, M. B., Shin, B., Datta, A., Raychaudhuri, P., and Costa, R. H. (2004). Foxm1b transcription factor is essential for development of hepatocellular carcinomas and is negatively regulated by the p19ARF tumor suppressor. *Genes Dev* 18, 830-850.
- Kamijo, T., Weber, J. D., Zambetti, G., Zindy, F., Roussel, M. F., and Sherr, C. J. (1998). Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8292-8297.
- Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M. F., Quelle, D. E., Downing, J. R., Ashmun, R. A., Grosveld, G., and Sherr, C. J. (1997). Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* 91, 649-659.
- Kataoka, H., Bonnefin, P., Vieyra, D., Feng, X., Hara, Y., Miura, Y., Joh, T., Nakabayashi, H., Vaziri, H., Harris, C. C., and Riabowol, K. (2003). ING1 represses transcription by direct DNA binding and through effects on p53. *Cancer Res* 63, 5785-5792.

- Kelly-Spratt, K. S., Gurley, K. E., Yasui, Y., and Kemp, C. J. (2004). p19Arf suppresses growth, progression, and metastasis of H-rasdriven carcinomas through p53-dependent and independent pathways. *PLoS Biology* 2.
- Kichina, J. V., Zeremski, M., Aris, L., Gurova, K. V., Walker, E., Franks, R., Nikitin, A. Y., Kiyokawa, H., and Gudkov, A. V. (2005). Targeted disruption of the mouse *ing1* locus results in reduced body size, hypersensitivity to radiation and elevated incidence of lymphomas. *Oncogene*.
- Kim, J. H., Yoon, S. Y., Kim, C. N., Joo, J. H., Moon, S. K., Choe, I. S., and Kim, J. W. (2004). The BMI1 oncoprotein is overexpressed in human colorectal cancer and correlates with the reduced p16INK4a/p14ARF proteins. *Cancer Letters* 203, 217-224.
- Kim, W. Y. S., N. E. (2006). The Regulation of INK4/ARF in Cancer and Aging. *Cell* 127, 265-275.
- Korgaonkar, C., Hagen, J., Tompkins, V., Frazier, A. A., Allamargot, C., Quelle, F. W., and Quelle, D. E. (2005). Nucleophosmin (B23) targets ARF to nucleoli and inhibits its function. *Molecular and Cellular Biology* 25, 1258-1271.
- Kuo, M. L., des Besten, W., Bertwistle, D., Roussel, M. F., and Sherr, C. J. (2004). N-terminal polyubiquitination and degradation of the ARF tumor suppressor. *Genes & Development* 18, 1862-1874.
- Kuo, M. L., Wang, Y., Wong, R. P. C., Campos, E. I., and Li, G. (2007). The ING1b tumor suppressor facilitates nucleotide excision repair by promoting chromatin accessibility to XPA. *Experimental Cell Research* 313, 1628-1638.
- Kuzmichev, A., Zhang, Y., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2002). Role of the Sin3-histone deacetylase complex in growth regulation by the candidate tumor suppressor p33(ING1). *Mol Cell Biol* 22, 835-848.
- Leduc, C., Claverie, P., Eymin, B., Col, E., Khochbin, S., Brambilla, E., and Gazzerie, S. (2006). p14ARF promotes RB accumulation through inhibition of its Tip60-dependent acetylation. *Oncogene* 25, 4147-4154.
- Leung, K. M., Po, L. S., Tsang, F. C., Siu, W. Y., Lau, A., Ho, H. T., and Poon, R. Y. (2002). The Candidate Tumor Suppressor ING1b Can Stabilize p53 by Disrupting the Regulation of p53 by MDM2. *Cancer Res* 62, 4890-4893.
- Lin, A. W., and Lowe, S. W. (2001). Oncogenic ras activates the ARF-p53 pathway to suppress epithelial cell transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5025-5030.
- Lingbeek, M. E. J., J. J. and Van Lohuizen, M. (2002). The T-box repressors TBX2 AND TBX3 specifically regulate the tumor suppressor gene p14ARF via a variant T site in the initiator. *Journal of Biological Chemistry* 277, 26120-26127.

- Lohrum, M. A. E., Ashcroft, M., Kubbutat, M. H. G., and Vousden, K. H. (2000). Identification of a cryptic nucleolar-localization signal in Mdm2. *Nature Cell Biology* 2, 179-181.
- Lowe, S. W., Cepero, E., and Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432, 307-315.
- Lowe, S. W., and Sherr, C. J. (2003). Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev* 13, 77-83.
- Llanos, S., Clark, P. A., Rowe, J., and Peters, G. (2001). Stabilization of p53 by p14ARF without relocation of MDM2 to the nucleolus. *Nat Cell Biol* 3, 445-452.
- Martelli, F., Hamilton, T., Silver, D. P., Sharpless, N. E., Bardeesy, N., Rokas, M., DePinho, R. A., Livingston, D. M., and Grossman, S. R. (2001). p19ARF targets certain E2F species for degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4455-4460.
- McMasters, K. M., Montes de Oca Luna, R., Pena, J. R., and Lozano, G. (1996). Mdm2 deletion does not alter growth characteristics of p53-deficient embryo fibroblasts. *Oncogene* 13, 1731-1736.
- Nagashima, M., Shiseki, M., Miura, K., Hagiwara, K., Linke, S. P., Pedeux, R., Wang, X. W., Yokota, J., Riabowol, K., and Harris, C. C. (2001). DNA damage-inducible gene p33ING2 negatively regulates cell proliferation through acetylation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9671-9676.
- Nouman, G. S., Anderson, J. J., Lunec, J., and Angus, B. (2003). The role of the tumour suppressor p33 ING1b in human neoplasia. *J Clin Pathol* 56, 491-496.
- Nourani, A., Doyon, Y., Utley, R. T., Allard, S., Lane, W. S., and Cote, J. (2001). Role of an ING1 growth regulator in transcriptional activation and targeted histone acetylation by the NuA4 complex. *Mol Cell Biol* 21, 7629-7640.
- Palmero, I., Murga, M., Zubiaga, A., and Serrano, M. (2002). Activation of ARF by oncogenic stress in mouse fibroblasts is independent of E2F1 and E2F2. *Oncogene* 21, 2939-2947.
- Palmero, I., Pantoja, C., and Serrano, M. (1998). p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras [letter]. *Nature* 395, 125-126.
- Palmero, I., and Serrano, M. (2001). Induction of senescence by oncogenic Ras. *Methods Enzymol* 333, 247-256.
- Pantoja, C., and Serrano, M. (1999). Murine fibroblasts lacking p21 undergo senescence and are resistant to transformation by oncogenic Ras. *Oncogene* 18, 4974-4982.
- Park, Y. B., Park, M. J., Kimura, K., Shimizu, K., Lee, S. H., and Yokota, J. (2002). Alterations in the INK4a/ARF locus and their effects on the growth of human osteosarcoma cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 133, 105-111.

Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N. J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H. W., *et al.* (1998). The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 92, 713-723.

Radfar, A., Unnikrishnan, I., Lee, H. W., DePinho, R. A., and Rosenberg, N. (1998). p19(Arf) induces p53-dependent apoptosis during abelson virus-mediated pre-B cell transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13194-13199.

Reef, S. (2006). A novel mitochondrial short form of p19ARF induces autophagy and caspase independent cell-death. *Molecular Cell* 22, 463-475.

Rizos, H., Woodruff, S., and Kefford, R. F. (2005). p14ARF interacts with the SUMO-conjugating enzyme and promotes the sumoylation of its binding partners. *Cell Cycle* 4, 567-603.

Robertson, K. D., and Jones, P. A. (1998). The human ARF cell cycle regulatory gene promoter is a CpG island which can be silenced by DNA methylation and down-regulated by wild-type p53. *Mol Cell Biol* 18, 6457-6473.

Rocha, S., Campbell, K. J., and Perkins, N. D. (2003). p53- and Mdm2-Independent Repression of NF-kappaB Transactivation by the ARF Tumor Suppressor. *Mol Cell* 12, 15-25.

Ruas, M., and Peters, G. (1998). The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta* 1378, F115-177.

Russell, M., Berardi, P., Gong, W., and Riabowol, K. (2006). Grow-ING, Age-ING and Die-ING: ING proteins link cancer, senescence and apoptosis. *Experimental Cell Research* 312, 951-961.

Ruthenburg, A. J., Allis, C. D., and Wysocka, J. (2007). Methylation of lysine 4 on histone 3: Intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Molecular Cell* 25, 15-31.

Scott, M., Boisvert, F. M., Vieyra, D., Johnston, R. N., Bazett-Jones, D. P., and Riabowol, K. (2001a). UV induces nucleolar translocation of ING1 through two distinct nucleolar targeting sequences. *Nucleic Acids Res* 29, 2052-2058.

Scott, M., Bonnefin, P., Vieyra, D., Boisvert, F. M., Young, D., Bazett-Jones, D. P., and Riabowol, K. (2001b). UV-induced binding of ING1 to PCNA regulates the induction of apoptosis. *J Cell Sci* 114, 3455-3462.

Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., and Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602.

Sharpless, N. E. (2005). INK4a/ARF: A Multifunctional tumor suppressor locus. *Mutational Research* 576, 22-38.

Sherr, C. J. (2001a). The ink4a/arf network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 731-737.

Sherr, C. J. (2001b). Parsing Ink4a/Arf. "Pure" p16-Null Mice. *Cell* 106, 531-534.

Sherr, C. J. (2006). Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nature Reviews* 6, 663-673.

Sherr, C. J., and Weber, J. D. (2000). The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev* 10, 94-99.

Shi, X., and Gozani, O. (2005). The fellowships of the ING's. *Journal of Cellular Biochemistry* 96, 1127-1136.

Shi, X., Hong, T., Walter, K. L., Ewalt, M., Michishita, E., Hung, T., Carney, D., Peña, P., Lan, F., Kaadige, M. R., *et al.* (2006). ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active repression. *Nature* 443, 1-4.

Shinoura, N., Muramatsu, Y., Nishimura, M., Yoshida, Y., Saito, A., Yokoyama, T., Furukawa, T., Horii, A., Hashimoto, M., Asai, A., *et al.* (1999). Adenovirus-mediated transfer of p33ING1 with p53 drastically augments apoptosis in gliomas. *Cancer Res* 59, 5521-5528.

Skowyra, D., Zeremski, M., Neznanov, N., Li, M., Choi, Y., Uesugi, M., Hauser, C. A., Gu, W., Gudkov, A. V., and Qin, J. (2001). Differential association of products of alternative transcripts of the candidate tumor suppressor ING1 with the mSin3/HDAC1 transcriptional corepressor complex. *J Biol Chem* 276, 8734-8739.

Sreeramaneni, R., Chaudhry, A., McMahon, M., Sherr, C. J., and Inoue, K. (2005). Ras-Raf-Arf signalling critically depends on the Dmp1 transcription factor. *Molecular and Cellular Biology* 25, 220-232.

Stott, F. J., Bates, S., James, M. C., McConnell, B. B., Starborg, M., Brookes, S., Palmero, I., Ryan, K., Hara, E., Vousden, K. H., and Peters, G. (1998). The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *Embo J* 17, 5001-5014.

Sui, G., Affar, E. L., Shi, Y., Brignone, C., Wall, N. R., Yin, P., Donohue, M., Luke, M. P., Calvo, D., Grossman, S. R., and Shi, Y. (2004). Ying Yang is a negative regulator of p53. *Cell* 117, 859-872.

Suzuki, H., and Wei, Y. (2005). The ARF tumor suppressor inhibits BCL6-mediated transcriptional repression. *Biochemical and Biophysical Research* 326, 242-248.

Takahashi, M., Ozaki, T., Todo, S., and Nakagawara, A. (2004). Decreased expression of the candidate tumor suppressor gene ING1 is associated with poor prognosis in advanced neuroblastomas. *Oncol Rep* 12, 811-816.

- Vieyra, D., Loewith, R., Scott, M., Bonnefin, P., Boisvert, F. M., Cheema, P., Pastyryeva, S., Meijer, M., Johnston, R. N., Bazett-Jones, D. P., *et al.* (2002). Human ING1 proteins differentially regulate histone acetylation. *J Biol Chem* *277*, 29832-29839.
- Vieyra, D., Senger, D. L., Toyama, T., Muzik, H., Brasher, P. M., Johnston, R. N., Riabowol, K., and Forsyth, P. A. (2003). Altered subcellular localization and low frequency of mutations of ING1 in human brain tumors. *Clinical Cancer Research* *9*, 5952-5962.
- Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network [news] [In Process Citation]. *Nature* *408*, 307-310.
- Vousden, K. H., and Lane, D. P. (2007). p53 in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *8*, 275-283.
- Wagner, M. J., and Helbing, C. C. (2005). Multiple variants of the ING1 and ING2 tumor suppressors are differentially expressed and thyroid hormone-responsive in *Xenopus laevis*. *Gen Comp Endocrinol*.
- Weber, J. D., Jeffers, J. R., Rehg, J. E., Randle, D. H., Lozano, G., Roussel, M. F., Sherr, C. J., and Zambetti, G. P. (2000). p53-independent functions of the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev* *14*, 2358-2365.
- Wei, W., Hemmer, R. M., and Sedivy, J. M. (2001). Role of p14(ARF) in replicative and induced senescence of human fibroblasts. *Mol Cell Biol* *21*, 6748-6757.
- Williams, R. T., Roussel, M. F., and Sherr, C. J. (2006). Arf gene loss enhances oncogenicity and limits imatinib response in mouse models of Bcr-Abl-induced acute lymphoblastic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 6688-6693.
- Xin, H., Yoon, H. G., Singh, P. B., Wong, J., and Qin, J. (2004). Components of a pathway maintaining histone modification and heterochromatin protein 1 binding at the pericentric heterochromatin in Mammalian cells. *J Biol Chem* *279*, 9539-9546.
- Zhang, Y., Xiong, Y., and Yarbrough, W. G. (1998). ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* *92*, 725-734.
- Zhong, Q., Gao, W., Du, F., and Wang, X. (2005). Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3ubiquitin ligase, catalyses the polyubiquitination of Mdl1 and regulates apoptosis. *Cell* *121*, 1085-1095.
- Zindy, F., Eischen, C. M., Randle, D. H., Kamijo, T., Cleveland, J. L., Sherr, C. J., and Roussel, M. F. (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* *12*, 2424-2433.

9. ANEXO

“A functional link between the tumor suppressors ARF and p33ING1”

Lara González¹, Jose M. P. Freije², Santiago Cal², Carlos López-Otín², Manuel Serrano³, Ignacio Palmero¹

Institute of Biomedical Research, CSIC-UAM, Spain¹. Institute of Oncology, University of Oviedo, Oviedo, E-33006, Spain². Spanish National Cancer Center, Madrid, Spain³.

SHORT COMMUNICATION

A functional link between the tumour suppressors ARF and p33ING1L González¹, JMP Freije², S Cal², C López-Otín², M Serrano³ and I Palmero¹¹Institute of Biomedical Research, CSIC-UAM, Arturo Duperier 4, Madrid, Spain; ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Oncology, University of Oviedo, Oviedo, Spain and ³Spanish National Cancer Center (CNIO), Melchor Fernandez Almagro 3, Madrid, Spain

The ARF tumour suppressor protein plays a critical role in the activation of p53 in response to oncogenic stress. ARF can activate p53 through nucleolar sequestration of Mdm2. However, several lines of evidence indicate that this is not the only way of action of ARF, and alternative mechanisms must exist. p33ING1 is a putative tumour suppressor, which induces cell-cycle arrest and apoptosis in a p53-dependent manner. Here, we describe that ARF and p33ING1 can interact *in vivo*. We also show that the subcellular localization of ING1 can be modulated by ARF protein levels, causing a displacement from nuclear to nucleolar localization. Finally, the ability of p33ING1 to cause cell-cycle arrest and induction of p21CIP1, or Mdm2, is impaired in ARF-deficient primary mouse fibroblasts. Based on these observations, we propose that the interaction with p33ING1 represents a novel mechanism for the tumour suppression function of ARF.

Oncogene advance online publication, 10 April 2006; doi:10.1038/sj.onc.1209526

Keywords: ARF; p53; ING1; tumour suppressor

Activation of the tumour suppressor protein p53 is a critical event in many cellular responses against potentially oncogenic stimuli (Vogelstein *et al.*, 2000). The ARF protein (p14ARF in humans and p19ARF in mice) is encoded in the INK4a/ARF locus, together with p16INK4a (Sherr, 2001). ARF exerts its tumor suppressor action through the activation of p53, in response to a variety of stress signals (Sherr, 2001; Lowe and Sherr, 2003). ARF can counteract Mdm2, a negative regulator of p53, through sequestration of Mdm2 in the nucleolus (Weber *et al.*, 2000). However, ARF can also cause cell-cycle arrest without relocation of Mdm2, and retains part of its antiproliferative effect in cells lacking Mdm2 and p53 (Weber *et al.*, 2000; Llanos *et al.*, 2001; Korgaonkar *et al.*, 2002; Yarbrough *et al.*, 2002; Kuo *et al.*, 2003). These observations clearly suggest the existence of alternative mechanisms for ARF tumour suppressor function. The Inhibitor of Growth (ING)

family of proteins includes several sequence-related proteins, encoded by at least five different loci in humans (reviewed by Feng *et al.*, 2002; Campos *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2005). ING proteins have been linked functionally to the p53 pathway at different levels, including the control of p53 protein stability, as transcriptional cofactors, or through post-translational modifications of p53 (Nagashima *et al.*, 2001; Nourani *et al.*, 2001; Gozani *et al.*, 2003). ING proteins also participate in chromatin remodelling through their association with histone deacetylases and histone acetyltransferases (Nourani *et al.*, 2001; Feng *et al.*, 2002; Kuzmichev *et al.*, 2002; Vieyra *et al.*, 2002; Xin *et al.*, 2004; Goeman *et al.*, 2005). The most extensively studied member of the ING family is p33ING1, one of the products of the ING1 locus (also referred to as p33ING1b, or ING1b elsewhere; Feng *et al.*, 2002). Interestingly, the ING1 locus is located in a region of frequent loss of heterozygosity, and p33ING1 is mutated, deleted, silenced or mislocalized in a large number of human tumours (reviewed by Nouman *et al.*, 2003; Gong *et al.*, 2005). Given the fact that ARF and p33ING1 are putative tumour suppressors linked to p53, we decided to explore the possibility that these two proteins could be functionally linked.

As an initial step to investigate possible links between ARF and p33ING1, we looked for interactions between these two proteins *in vivo*. To this end, we transiently transfected 293T human epithelial cells with vectors directing the expression of p14ARF, and an AU5-tagged version of human p33ING1. The association between these two proteins was studied by immunoprecipitation followed by Western blotting, using total protein extracts from cells transfected with both constructs. When a specific antibody against p14ARF was used for immunoprecipitation, we were able to detect both p14ARF and p33ING1 in the immunocomplex, indicating that the two proteins can associate in the cell (Figure 1a). The interaction was specific, as shown by the use of a non-related serum. The association could also be observed in a reverse experiment, using the anti-AU5 antibody for immunoprecipitation, although in this case, the signal obtained after Western blotting with an anti-p14ARF antibody was much weaker (Figure 1b). To confirm whether the observed interaction occurred between the endogenous proteins, we carried out immunoprecipitation experiments with an antibody against p14ARF in untransfected 293T cells

Correspondence: Dr I Palmero, Institute of Biomedical Research, CSIC-UAM, Arturo Duperier 4, Madrid E-28029, Spain.

E-mail: ipalmero@iib.uam.es

Received 28 October 2004; revised 22 February 2006; accepted 27 February 2006

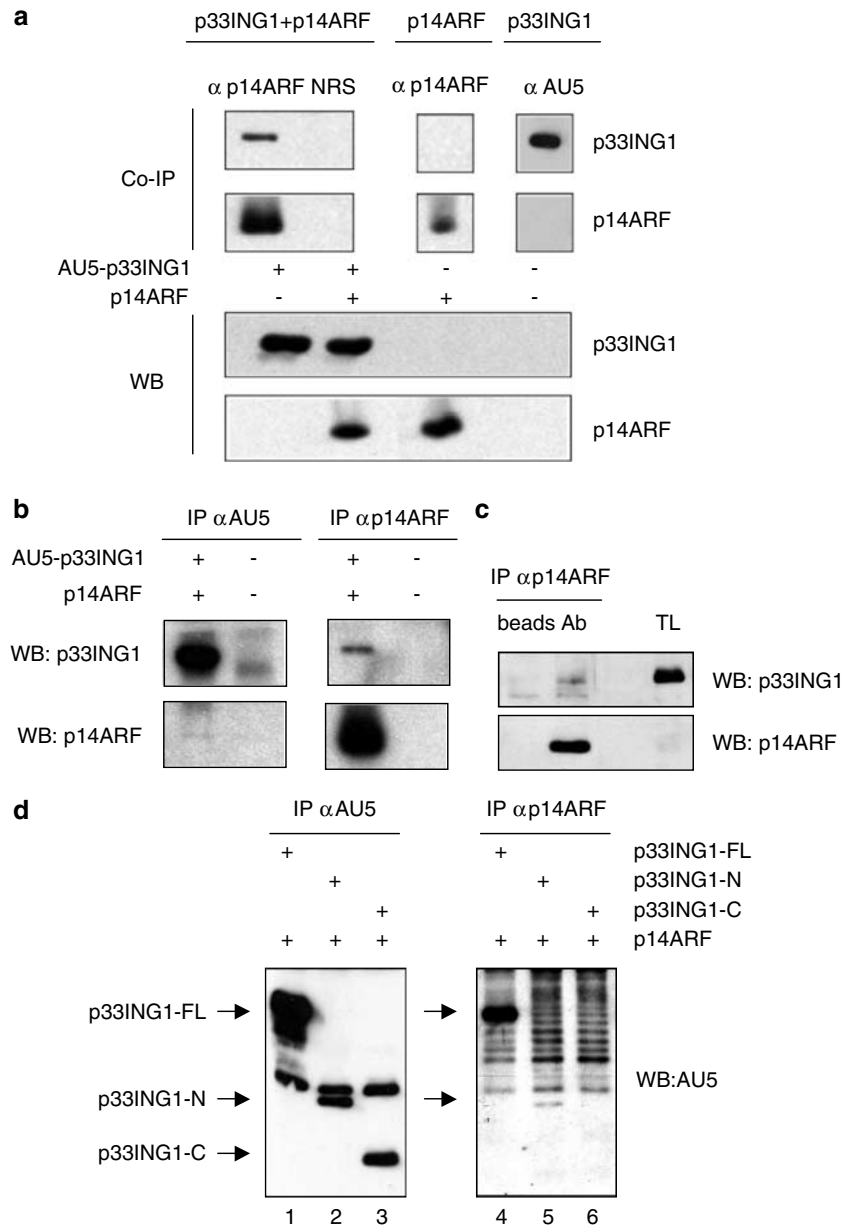


Figure 1 Physical interaction between p14ARF and p33ING1. (a) 293T cells were transiently transfected with vectors expressing p14ARF and AU5-tagged p33ING1, using a standard calcium phosphate protocol. Total protein lysates were prepared as previously described (Pantoja and Serrano, 1999; Palmero *et al.*, 2002). For immunoprecipitation, lysates containing 1 mg of protein were incubated with 1 μ l of an antibody against p14ARF (DP40, a generous gift of David Parry, DNAX Research Institute, 1:500 dilution), against the AU5 tag (MMS-135R, BabCO, 1:1000 dilution), or a non-related serum (NRS), overnight at 4°C, with constant rotation. Thirty microlitres of a slurry containing Protein A beads (Pharmacia), preblocked with 3% powder milk in lysis buffer for 1 h at 4°C, was added to the mix and incubated for 1 h in the same conditions. Beads were washed four times with ice-cold lysis buffer and incubated with 2 \times SDS loading buffer (20 μ l per immunoprecipitation) for 5 min at 90°C to release bound proteins. The presence of each protein in the immunocomplex was analysed by Western blotting with antibodies against p14ARF or the AU5 tag. Controls with cells transfected with p14ARF alone or p33ING1 alone are also shown. The bottom panel shows a Western blot analysis of the total lysates used in the above-described immunoprecipitation. (b) 293T cells were transfected as indicated and analysed by immunoprecipitation as in (a), using antibodies against the AU5 tag and against p14ARF for immunoprecipitation. Ectopic p33ING1 was detected by Western blotting with an antibody against the AU5 tag. (c) Non-transfected 293T cells were analysed by immunoprecipitation as in (a), using an antibody against p14ARF for immunoprecipitation. Endogenous p33ING1 was detected with the LG1 antiserum. (d) 293T cells were transfected with vectors for p14ARF and the indicated AU5-p33ING1 deletion constructs, and analysed by immunoprecipitation followed by Western blotting, as described in (a). Note that the exposure shown in the right-hand panel is about threefold longer than in the left-hand panel.

(Figure 1c). Western blotting with an antiserum against the C-terminus of p33ING1 (LG1) revealed a specific band comigrating with p33ING1 in the p14ARF

immunoprecipitate, indicative of interaction between the endogenous proteins. It should be noted that 293T cells express moderate levels of p33ING1, but low levels

of p14ARF. Similar results have been obtained using H1299 cells (data not shown). Next, we sought to define the p33ING1 domains involved in this interaction. We have recently defined two functional motifs, in the N- and C-terminus of p33ING1, which are important for its activity (Goeman *et al.*, 2005). After co-transfection of p14ARF with specific deletion constructs for p33ING1 in 293T cells, we were able to observe co-precipitation between p14ARF and a mutant protein containing residues 1–171 of p33ING1 (p33ING1-N), whereas no interaction was observed with a C-terminal construct containing residues 172–279 (p33ING1-C), indicating that the N-terminal domain of p33ING1 is sufficient for binding to p14ARF (Figure 1d).

The ARF protein localizes predominantly in the nucleolus (Sherr, 2001). It is well established that ARF can provoke the displacement to the nucleolus of proteins with which it interacts, such as Mdm2 (Weber *et al.*, 1999). The functional relevance of this ARF-mediated nucleolar sequestration is a matter of debate (Llanos *et al.*, 2001; Korgaonkar *et al.*, 2002), but, nevertheless, it is a hallmark of all the known bona fide interactions with ARF. Accordingly, we decided to analyse whether ARF protein levels had any effect on the subcellular localization of p33ING1. To this end, we used NIH-3T3 mouse fibroblasts, which carry a deletion in the entire *INK4a/ARF* locus, and analysed the cellular localization of ectopically expressed p33ING1 by indirect immunofluorescence. Consistent with previous reports (Scott *et al.*, 2001a, b), we observed a uniform nuclear staining for p33ING1 in these *ARF*-null cells (Figure 2a, top panel). However, when we restored ARF function to these cells, by co-transfection with a vector expressing p14ARF, a dramatic change in p33ING1 localization was observed, resulting in accumulation of the p33ING1 signal in the nucleoli (Figure 2a, middle panel; Figure 2b). To validate this observation in a more physiological setting, we wished to know whether changes in the level of endogenous ARF protein could have a similar effect on p33ING1 localization. With this purpose, early passage, wild-type mouse embryo fibroblasts (MEFs) were retrovirally transduced with a vector expressing the oncogenic form of human Ha-Ras (RasV12) and subsequently transfected with a vector expressing AU5-p33ING1. ARF is a critical mediator of the antiproliferative response of primary mouse fibroblasts to RasV12, and exposure to this oncogenic stress results in a dramatic induction of p19ARF in these cells, as shown in Figure 2f (Serrano *et al.*, 1997; Palmero *et al.*, 1998). In a similar manner to that observed in *ARF*-null NIH-3T3, the increase in endogenous p19ARF levels caused by RasV12 expression was accompanied in a large majority of cells by a shift in the staining pattern of p33ING1 to a predominantly nucleolar localization (Figure 2c). This shift in localization of ectopic p33ING1 was also observed in MEFs doubly deficient for p53 and Mdm2, indicating that both proteins are dispensable for this effect (Figure 2d). Note that the p53/Mdm2-null MEFs showed a tendency to accumulate p33ING1 in nucleoli in the absence of ectopic p14ARF, which most likely

reflects their higher p19ARF basal levels relative to wild-type MEFs (Figure 2g). The impact of p14ARF levels in p33ING1 localization was further studied using the fluorescent fusion proteins dsRed-p33ING1 and GFP-p14ARF (Figure 2e). When these constructs were ectopically expressed in 293T cells, either individually or together, the pattern of subcellular localization observed for dsRed-p33ING1 was very similar to that described in Figure 2a and c. 293T cells are refractory to the antiproliferative effect of p14ARF, because of the expression of SV40 large T antigen in these cells (Pomerantz *et al.*, 1998). Therefore, these results also suggest that the observed shift in p33ING1 localization is a direct consequence of its interaction with p14ARF, and not due to changes in cell-cycle profiles. In support of this notion, we have also observed that *ARF*-null NIH-3T3 cells made quiescent by serum starvation retain a uniform nuclear distribution of ectopic p33ING1 (data not shown). The characteristic nucleolar localization of p14ARF or p19ARF was not affected by the levels of p33ING1 in any case (compare middle and bottom panels in Figure 2a, c and e). It is worth mentioning that a similar accumulation of p33ING1 in nucleoli has been described to occur in human diploid fibroblasts upon exposure to high doses of UV radiation (Scott *et al.*, 2001a). In that study, mutant versions of the p33ING1 protein that did not relocalize in the nucleolus showed a reduced ability to induce apoptosis. These observations, together with our data, strongly indicate that relocation to the nucleolus plays an important role in p33ING1 function, and suggest a relevant role for ARF in this process.

Overexpression of p33ING1 has been shown to induce cell-cycle arrest and/or apoptosis in several cell types. In all cases, these responses require the presence of functional p53 (Shinoura *et al.*, 1999; Nagashima *et al.*, 2001). Prompted by the connections between ARF and p33ING1 described above, we decided to investigate whether ARF was required for the activation of p53-mediated responses by p33ING1. To this end, early-passage MEFs of wild-type or *p19ARF*^{-/-} genotypes were retrovirally transduced with a vector expressing p33ING1. *p53/Mdm2*^{-/-} MEFs were used as controls. As expected, p33ING1 expression in wild-type MEFs resulted in a clear reduction in the number of 5-bromodeoxyuridine (BrdU)-positive cells (Figure 3a). On the contrary, *ARF*-null MEFs were largely refractile to the antiproliferative effects of ING1 and retained a normal proliferation rate, evidenced by the similar percentage of BrdU-positive cells in vector- and p33ING1-infected cells. The proliferation rate of *p53/Mdm2*^{-/-} MEFs was not affected by p33ING1 expression, in accordance with the reported requirement of p53 for p33ING1 function. Similar results were obtained when the rate of thymidine incorporation was measured (data not shown). Retroviral ectopic expression of p33ING1 in MEFs of either genotype did not cause a significant increase in apoptosis (Supplementary Figure 1). The induction of the p53 target, p21CIP1, is the most robust readout of ING-dependent p53 activation (Nagashima *et al.*, 2001). p21CIP1 contributes

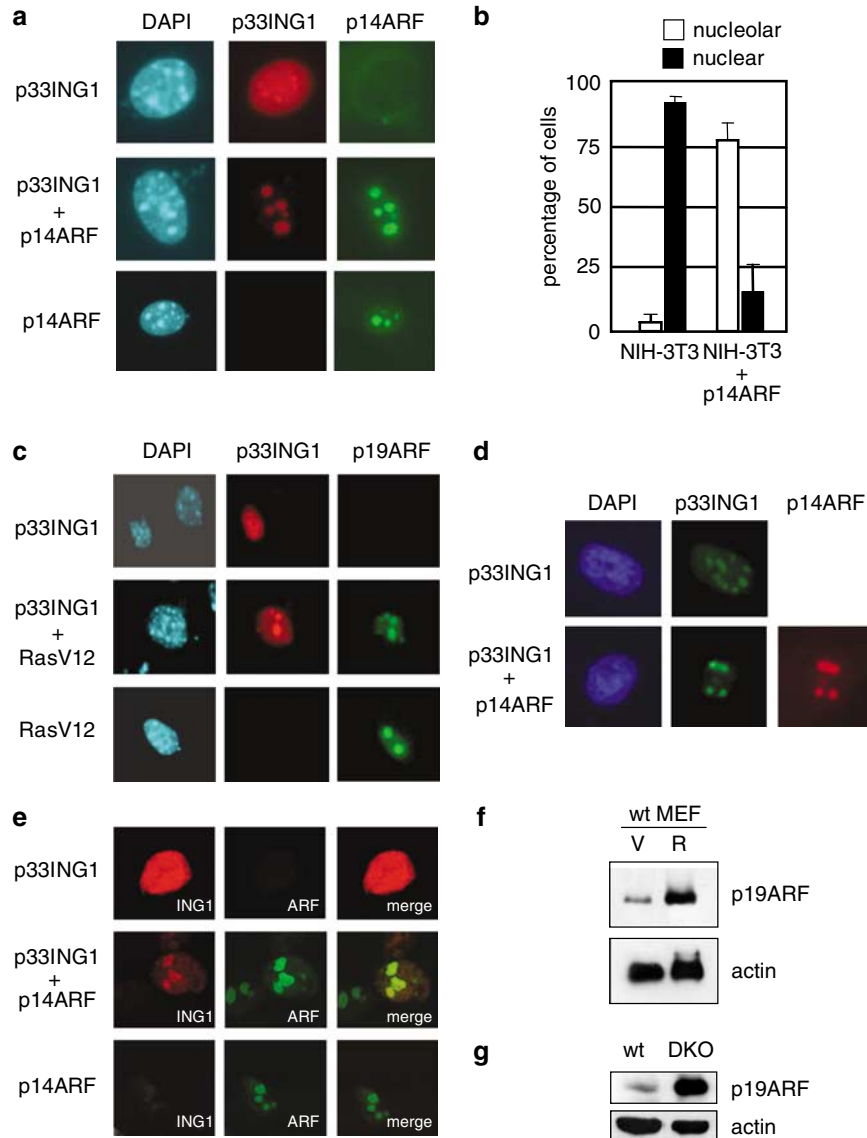


Figure 2 Effects of ARF levels on the subcellular localization of p33ING1. **(a)** NIH-3T3 immortal murine fibroblasts growing on glass coverslips (LabTek) were transiently transfected with vectors encoding AU5-p33ING1, p14ARF or both as indicated, using Fugene 6 (Roche, Mannheim, Germany). Twenty-four hours later, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS), permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS and incubated in blocking solution (PBS containing 2% bovine serum albumin), overnight at 4°C. Cells were then incubated with the relevant antibodies in blocking solution for 60 min at room temperature, and washed with PBS (3–4 washes, 15 min each) before incubation with fluorochrome-conjugated secondary antibodies, and washing in the same conditions used with the primary antibodies. Cells were mounted with Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) containing 4,6-diamidino-2-phenylindole. **(b)** Percentage of cells showing staining for p33ING1 predominantly in nucleoli (*nucleolar*) or evenly distributed in the nucleus (*nuclear*), in the absence or presence of p14ARF. The data shown are the average of two experiments. At least 200 cells per experiment were scored for each point. **(c)** Wild-type, early-passage mouse embryo fibroblasts (MEFs) were retrovirally transduced with a vector encoding RasV12, or an empty vector, and subsequently transfected with a vector expressing AU5-p33ING1. The subcellular localization of each protein was analysed as described in **(a)**. To detect human p14ARF, we used a 1:200 dilution of rabbit polyclonal DP40; mouse p19ARF was detected with rabbit polyclonal R562 (Abcam, Cambridge, UK, 1:200 dilution) and AU5-tagged p33ING1 protein was detected with anti-AU5 mouse monoclonal MMS-135R from Babco, Berkeley, CA, USA, at a 1:1000 dilution. As secondary fluorochrome-conjugated antibodies, we used Cy3-conjugated goat anti-mouse (Jackson Laboratories, West Grove, PA, USA, 1:800 dilution) and Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA, 1:400 dilution). **(d)** Mouse embryo fibroblasts doubly deficient for p53 and Mdm2 were transiently transfected with vectors encoding AU5-p33ING1, p14ARF or both as indicated, and analysed by immunofluorescence as described in **(a)**. **(e)** 293T cells were transfected with vectors encoding DsRed-p33ING1 or GFP-p14ARF, and processed as described in **(a)**, except for the absence of primary and secondary antibodies. **(f)** Western blot analysis showing the changes in p19ARF protein levels after RasV12 retroviral infection of wild-type MEFs. **(g)** Western blot analysis of basal levels of p19ARF in the wild-type and p53/Mdm2-null MEFs used for immunofluorescence.

significantly, although not exclusively, to the antiproliferative effects of p53 (Brugarolas *et al.*, 1995; Deng *et al.*, 1995; Pantoja and Serrano, 1999). Therefore, p21CIP1 protein levels were analysed as a measure of the effectiveness of ING1 to trigger p53-dependent responses in these cells. Wild-type MEFs showed a clear induction of p21 upon retroviral infection with p33ING1 (Figure 3b and c). In accordance with the lack of antiproliferative effect of p33ING1 in *ARF*-null MEFs, p21CIP1 levels did not change significantly in these cells upon introduction of p33ING1 (Figure 3b and c). p21CIP1 was undetectable in *p53/Mdm2*^{-/-} MEFs infected with p33ING1 or empty vector (data not shown). To determine whether the presence of functional ARF had a general impact on p53-dependent gene expression triggered by p33ING1, we extended our analysis to Mdm2, a p53 target whose expression can be

modulated by p33ING1 (Shimada *et al.*, 2002). Mdm2 levels were significantly increased in p33ING1-infected wild-type MEFs, but a much-reduced effect was observed in p33ING1-infected *ARF*-null MEFs (Figure 3b and c). It has been suggested that ING proteins can control p53 protein stability, possibly by interfering with Mdm2-mediated degradation of p53 (Leung *et al.*, 2002). Given the well-established role for ARF in the control of p53 protein stability, we wished to investigate a possible effect of ARF at this level. As shown in Figure 3b, ectopic expression of p33ING1 resulted in a modest but reproducible increase in p53 protein levels, both in wild-type and *ARF*-null MEFs, arguing against the participation of ARF in p33ING1-mediated p53 protein stabilization. We have also observed that deletions including either the N-terminus or the C-terminus of p33ING1 are unable to trigger cell-cycle arrest to the same extent as the full-length protein, this effect being more obvious for the C-terminal construct. This is in agreement with previous observations in human diploid fibroblasts (Goeman *et al.*, 2005). Interestingly, both deletion constructs showed an impaired capacity to increase p53 levels, and accordingly p21CIP1 and Mdm2 (Supplementary Figure 2). From these data, we conclude that stabilization of p53 and interaction with ARF appear to be separable functions of p33ING1. These observations clearly suggest that ARF is required for the induction by p33ING1 of cell-cycle arrest and p53-mediated transactivation, and highlight the functional relevance of the interaction between ARF and p33ING1.

In this report, we have presented evidence that indicates that the tumour suppressors ARF and p33ING1 are functionally linked. We show that both proteins can interact, that the subcellular location of p33ING1 can be modulated by ARF and that the ability of p33ING1 to provoke cell-cycle arrest and trigger p53-dependent transactivation requires functional ARF. There are several possible mechanisms by which ARF

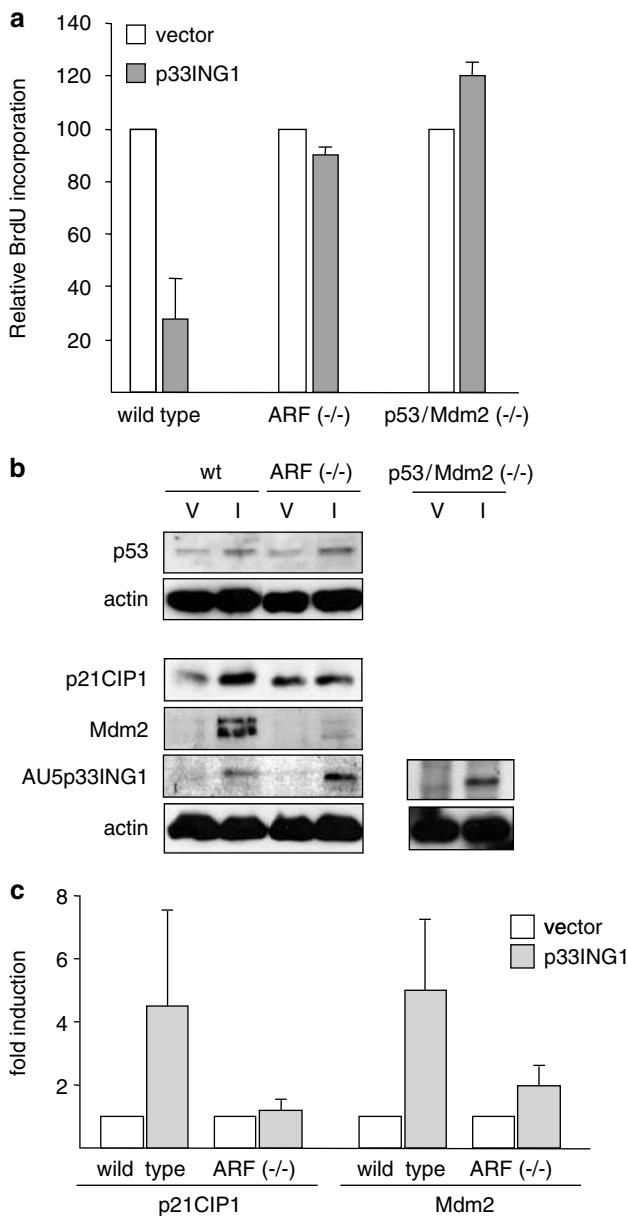


Figure 3 Requirement of ARF function for cell-cycle arrest and gene activation by p33ING1. **(a)** The proliferation rates of wild-type, *ARF*-null and *p53/Mdm2*-null early-passage mouse embryo fibroblasts (MEFs) infected with a retrovirus encoding AU5-p33ING1 or an empty vector were estimated by measuring their rate of 5-bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation. Infected MEFs were plated on glass coverslips, and 24 h later, were incubated with BrdU (10 μ M final concentration, 2 h). Cells that were positive for BrdU were detected by indirect immunofluorescence with antibody BP40250 from Megabase Research Products, Lincoln, NE, USA (1:1000 dilution). The data are the average of three independent experiments. A total of 100–250 cells were counted for each point. **(b)** Western blotting analysis of the levels of p53, p21CIP1, Mdm2 and AU5p33ING1 in MEFs of the indicated genotypes, infected with empty vector (V) or pLPCAU5p33ING1 (I). The following antibodies were used: anti-p53 (CM5p, Novocastra, Newcastle, UK, 1:500), anti-p21 (C19, Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA, 1:500), anti-Mdm2 (2A10, a gift of Jesus Gil, Cancer Research UK, 1:250), anti-AU5 (MMS-135R, Babco, 1:1000) and anti- β -actin (AC-15, Sigma, St Louis, MO, USA, 1:10000). **(c)** For quantitation, the signal for p21CIP1 or Mdm2 from four independent experiments was normalized by the signal for actin for each sample, and the value for the empty vector-infected cells was taken as reference.

and p33ING1 might cooperate. On the one hand, it has been suggested that ING proteins can control p53 protein stability, in connection with Mdm2 (Zeremski *et al.*, 1999; Leung *et al.*, 2002). Despite the important role of ARF in the control of p53 protein stability in other settings, our data indicate that p53 stabilization by p33ING1 does not require ARF, in agreement with the suggestion of competitive binding of Mdm2 and p33ING1 to p53 (Leung *et al.*, 2002). Furthermore, the analysis of deletion mutants indicates that p53 stabilization and ARF binding do not correlate. Other alternative levels of functional link must therefore be contemplated. In this regard, recent reports show that ARF plays an important role in ribosomal biogenesis, in the nucleolus (Itahana *et al.*, 2003; Sugimoto *et al.*, 2003; Bertwistle *et al.*, 2004). As p33ING1 can also accumulate in the nucleolus (Figure 2; see also Scott *et al.*, 2001a), a possible functional connection at this level is possible. More importantly, there is ample evidence, both in mammals and yeast, showing that ING proteins can form complexes with histone deacetylases and histone acetyltransferases. Based on this, it has been suggested that ING proteins could play a role in transcriptional control, through chromatin remodelling (Nourani *et al.*, 2001; Skowyrza *et al.*, 2001; Feng *et al.*, 2002; Kuzmichev *et al.*, 2002; Vieyra *et al.*, 2002; Xin *et al.*, 2004; Goeman *et al.*, 2005). An increasing number of evidences indicate that ARF can have a direct role in

transcriptional control (Kamijo *et al.*, 1998; Rocha *et al.*, 2003, 2005; Calabro *et al.*, 2004; D'Amico *et al.*, 2004; Datta *et al.*, 2004; Kalinichenko *et al.*, 2004; Qi *et al.*, 2004) and, therefore, it is feasible that ARF might cooperate with p33ING1 in transcriptional regulation, through chromatin remodelling processes. Our data showing a clear effect of ARF on p33ING1-dependent transactivation, in the absence of effects on p53 protein levels, are consistent with this hypothesis. In this regard, it is important to note that the N-terminal domain of p33ING1, which is sufficient for binding to p14ARF, is implicated in histone deacetylase-mediated transcriptional repression (Goeman *et al.*, 2005). Further understanding of the functional connection between ARF and p33ING1 should provide important information about the mechanisms underlying the role of these two proteins in tumour suppression.

Acknowledgements

We are grateful to Charles Sherr for *p19ARF*-null mice, to Gigi Lozano for *p53/Mdm2*-null MEFs, to Gordon Peters for GFP-p14ARF constructs and to Aria Baniahmad for p33ING1 deletion constructs. This work was supported by Grants INTACT (to MS) from the EU, and by Grants SAF2005-03018 (to MS), SAF03-0244 (to CLO) and SAF2003-00801 (to IP) from the Spanish Ministry of Science and Technology.

References

- Bertwistle D, Sugimoto M, Sherr CJ. (2004). *Mol Cell Biol* **24**: 985–996.
- Brugarolas J, Chandrasekaran C, Gordon JI, Beach D, Jacks T, Hannon GJ. (1995). *Nature* **377**: 552–557.
- Calabro V, Mansueto G, Santoro R, Gentilella A, Pollice A, Ghioni P *et al.* (2004). *Mol Cell Biol* **19**: 8529–8540.
- Campos EI, Chin MY, Kuo WH, Li G. (2004). *Cell Mol Life Sci* **61**: 2597–2613.
- D'Amico M, Wu K, Fu M, Rao M, Albanese C, Russell RG *et al.* (2004). *Cancer Res* **64**: 4122–4130.
- Datta A, Nag A, Pan W, Hay N, Gartel AL, Colamonici O *et al.* (2004). *J Biol Chem* **279**: 36698–36707.
- Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P. (1995). *Cell* **25**: 675–684.
- Feng X, Hara, Riabowol K. (2002). *Trends Cell Biol* **12**: 532–538.
- Goeman F, Thormeyer D, Abad M, Schmidt O, Serrano M, Palmero I *et al.* (2005). *Mol Cell Biol* **25**: 422–431.
- Gong W, Suzuki K, Russell M, Riabowol K. (2005). *Int J Biochem Cell Biol* **37**: 1054–1065.
- Gozani O, Karuman P, Jones DR, Ivanov D, Cha J, Lugovskoy AA *et al.* (2003). *Cell* **114**: 99–111.
- Itahana K, Bhat KP, Jin A, Itahana Y, Hawke D, Kobayashi R *et al.* (2003). *Mol Cell* **12**: 1151–1164.
- Kalinichenko VV, Major ML, Wang X, Petrovic V, Kuechle J, Yoder HM *et al.* (2004). *Genes Dev* **18**: 830–850.
- Kamijo T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F, Roussel MF, Sherr CJ. (1998). *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 8292–8297.
- Korgaonkar C, Zhao L, Modestou M, Quelle DE. (2002). *Mol Cell Biol* **22**: 196–206.
- Kuo ML, Duncavage EJ, Mathew R, den Besten W, Pei D, Naeve D *et al.* (2003). *Cancer Res* **63**: 1046–1053.
- Kuzmichev A, Zhang Y, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. (2002). *Mol Cell Biol* **22**: 835–848.
- Leung KM, Po LS, Tsang FC, Siu WY, Lau A, Ho HT *et al.* (2002). *Cancer Res* **62**: 4890–4893.
- Llanos S, Clark PA, Rowe J, Peters G. (2001). *Nat Cell Biol* **3**: 445–452.
- Lowe SW, Sherr CJ. (2003). *Curr Opin Genet Dev* **13**: 77–83.
- Nagashima M, Shiseki M, Miura K, Hagiwara K, Linke SP, Pedoux R *et al.* (2001). *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 9671–9676.
- Nouman GS, Anderson JJ, Lunec J, Angus B. (2003). *J Clin Pathol* **56**: 491–496.
- Nourani A, Doyon Y, Utley RT, Allard S, Lane WS, Cote J. (2001). *Mol Cell Biol* **21**: 7629–7640.
- Palmero I, Murga M, Zubiaga A, Serrano M. (2002). *Oncogene* **21**: 2939–2947.
- Palmero I, Pantoja C, Serrano M. (1998). *Nature* **395**: 125–126.
- Pantoja C, Serrano M. (1999). *Oncogene* **18**: 4974–4982.
- Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L *et al.* (1998). *Cell* **92**: 713–723.
- Qi Y, Gregory MA, Li Z, Brousal JP, West K, Hann SR. (2004). *Nature* **431**: 712–717.
- Rocha S, Campbell KJ, Perkins ND. (2003). *Mol Cell* **12**: 15–25.
- Rocha S, Garrett MD, Campbell KJ, Schumm K, Perkins ND. (2005). *EMBO J* **24**: 1157–1169.
- Scott M, Boisvert FM, Vieyra D, Johnston RN, Bazett-Jones DP, Riabowol K. (2001a). *Nucleic Acids Res* **29**: 2052–2058.

- Scott M, Bonnefin P, Vieyra D, Boisvert FM, Young D, Bazett-Jones DP *et al.* (2001b). *J Cell Sci* **114**: 3455–3462.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. (1997). *Cell* **88**: 593–602.
- Sherr CJ. (2001). *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 731–737.
- Shimada H, Liu TL, Ochiai T, Shimizu T, Haupt Y, Hamada H *et al.* (2002). *Oncogene* **21**: 1208–1216.
- Shinoura N, Muramatsu Y, Nishimura M, Yoshida Y, Saito A, Yokoyama T *et al.* (1999). *Cancer Res* **59**: 5521–5528.
- Skowrya D, Zeremski M, Neznanov N, Li M, Choi Y, Uesugi M *et al.* (2001). *J Biol Chem* **276**: 8734–8739.
- Sugimoto M, Kuo ML, Roussel MF, Sherr CJ. (2003). *Mol Cell* **11**: 415–424.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. (2000). *Nature* **408**: 307–310.
- Vieyra D, Loewith R, Scott M, Bonnefin P, Boisvert FM, Cheema P *et al.* (2002). *J Biol Chem* **277**: 29832–29839.
- Weber JD, Jeffer JR, Rehg JE, Randle DH, Lozano G, Roussel MF *et al.* (2000). *Genes Dev* **14**: 2358–2365.
- Weber JD, Taylor LJ, Roussel MF, Sherr CJ, Bar-Sagi D. (1999). *Nat Cell Biol* **1**: 20–26.
- Xin H, Yoon HG, Singh PB, Wong J, Qin J. (2004). *J Biol Chem* **279**: 9539–9546.
- Yarbrough WG, Bessho M, Zanation A, Bisi JE, Xiong Y. (2002). *Cancer Res* **62**: 1171–1177.
- Zeremski M, Hill JE, Kwek SS, Grigorian IA, Gurova KV, Garkavtsev IV *et al.* (1999). *J Biol Chem* **274**: 32172–32181.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)