



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR**

**FUNCIÓN DE LA E3 UBIQUITINA LIGASA APC/C-
CDH1 EN LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL
INDUCIDA POR ÁCIDO RETINOICO**

**JULIA CUENDE VILLASUR
2009**

INTRODUCCIÓN

1. LOS NEUROBLASTOMAS.

1.1 Descripción y clasificaciones.

Los neuroblastomas son tumores formados por células neuroectodérmicas no diferenciadas, derivadas de la cresta neural. Son los tumores sólidos extracraneales más frecuentes en la infancia. Cada año se diagnostican de 1 a 3 nuevos casos por cada 100.000 niños menores de 15 años, lo que supone el 9% de los cánceres en pacientes pediátricos y el 50% de todas las neoplasias malignas detectadas en la infancia. El diagnóstico se realiza en el 90% de los casos en los primeros 5 años de vida (Brodeur 2003; Schwab *et al.*, 2003; Castel *et al.*, 2007).

Al tener su origen en las células de la cresta neural, los tumores pueden desarrollarse en cualquier zona dentro del sistema nervioso simpático. Sin embargo, la mayor parte (65%) de los neuroblastomas se localizan en el abdomen, y dentro de éstos, aproximadamente la mitad se detectan en la médula adrenal. Existen otras localizaciones frecuentes como son el cuello, el pecho y la pelvis. Además, la mitad de los pacientes presentan metástasis hacia puntos distantes como son el hueso, el hígado y los nódulos linfáticos no adyacentes, de las que se extienden a nódulos linfáticos adyacentes al foco primario del tumor. Todo esto determina que la aparición de los síntomas sea muy variable (Brodeur 2003; Maris *et al.*, 2007).

La etiología del neuroblastoma es aún desconocida, pero parece poco probable que esté relacionada con la exposición a factores medioambientales. Aunque no es una enfermedad hereditaria, existe un subgrupo de pacientes que muestra predisposición a desarrollar la enfermedad, siguiendo un patrón de herencia autosómico dominante (Brodeur 2003).

Los neuroblastomas se pueden clasificar en diferentes subtipos en función del estadio de la enfermedad, definido por el “Sistema Internacional de Estratificación del Neuroblastoma” (INSS) (Brodeur *et al.*, 1993). Esta clasificación divide a los neuroblastomas en 4 estadios: 1, 2a, 2b, 3, 4, 4S, dependiendo de la extensión del tumor, la implicación de los nódulos linfáticos y la extensión metastásica.

El pronóstico de la enfermedad se realiza en función de varios parámetros, como son el estadio, la edad del paciente en el diagnóstico y la localización del tumor primario. Sin embargo estas características predicen de forma imperfecta el progreso de la enfermedad, por lo que se necesitan marcadores pronósticos adicionales. De hecho, la evolución de los neuroblastomas es muy variable, ya que tienen un comportamiento biológico casi impredecible, en unas ocasiones muy agresivo y resistente al tratamiento y, en otras, muestran una regresión progresiva o signos de maduración espontánea o inducida por el tratamiento. Así, Los tumores del estadio 4S (“S”: especial) a menudo sufren regresión espontánea y presentan buen pronóstico (Brodeur 2003; Schwab *et al.*, 2003).

Histológicamente, la mayor parte de los neuroblastomas son tumores indiferenciados compuestos por células pequeñas y redondeadas que pueden presentar evidencias de diferenciación neuronal. En algunos casos pueden madurar a ganglioneuroblastomas, tumores que muestran una diferenciación parcial. Menos frecuentemente, pueden evolucionar hacia ganglioneuromas, que son agrupaciones de neuronas maduras rodeados por un denso estroma de células de Schwann (Johnsen *et al.*, 2009). Sin embargo, esta clasificación histológica no posee valor pronóstico. En los años 80, Shimada y col. establecieron la denominada clasificación de Shimada (Shimada *et al.*, 1984), que relaciona las características histopatológicas del tumor con

el comportamiento clínico, que presenta un elevado valor pronóstico. Esta clasificación divide a los tumores en favorables o desfavorables dependiendo del grado de diferenciación neuroblástica, el contenido del estroma en células de Schwann, la alteración nuclear de las células neuroblásticas (índice de mitosis, picnosis, cariorresis) y la edad de establecimiento del diagnóstico.

Asimismo, se han descrito diversas alteraciones genéticas, utilizadas como biomarcadores con valor pronóstico (Castel *et al.*, 2007), como son el índice de DNA ó ploidía (DI), las ganancias de material genético, como la amplificación del gen *MMYC* y el aumento en el número de copias del cromosoma 17q, las pérdidas de material genético, como las pérdidas de heterocigosidad en los cromosomas 1q, 11q ó 14 q, y la alteración de la expresión de los genes *TRK*.

1.1.1. Amplificación del oncogen *MMYC*.

La amplificación génica se define como un cambio genómico localizado que da lugar al incremento numérico del gen o genes afectados. Es uno de los principales mecanismos patológicos que desencadena la activación de proto-oncogenes con potencial oncogénico. El gen *MMYC* se localiza en el cromosoma 2p23-24. Sin embargo, en las células que presentan amplificación se encuentra también en las DMs (“Double Minutes”) ó en las HSRs (“homogeneously staining region”) del DNA (Corvi *et al.*, 1994 Schwab, 1984, 288).

Aunque en un principio se pensó que la amplificación de *MMYC* era exclusiva de neuroblastoma (Schwab *et al.*, 1983). Sin embargo, se observó que esta amplificación de *MMYC* aparece además en otros tipos de tumores neuronales como son: glioblastomas (Collins 1993; Hui *et al.*, 2001), meduloblastomas (Rouah *et al.*, 1989;

Schutz *et al.*, 1996; Bayani *et al.*, 2000; Fruhwald *et al.*, 2000), retinoblastomas (Lee *et al.*, 1984; Squire *et al.*, 1985; Godbout and Squire 1993) y los astrocitomas (Garson *et al.*, 1985) entre otros.

El incremento del número de copias de *MMYC* en neuroblastomas puede oscilar entre 10 y 500 copias. El tamaño de la región amplificada puede variar desde 100 Kb a más de 1 Mb. Las regiones del DNA que resultan amplificadas junto con *MMYC* no presentan reajustes notables respecto a la organización genómica original, y se presentan en forma de repeticiones directas en tandem, como se ha observado en muchas HSRs (Schwab 1998). Estos hechos hicieron pensar que existían elevadas probabilidades de encontrar otros genes co-amplificados junto con *MMYC*. Así, se observó que los genes DXX1 (“DEAD box 1”) y NAG (“neuroblastoma amplified gene”) también pueden co-amplificar junto con *MMYC*, aunque esporádicamente (Amler *et al.*, 1996; Wimmer *et al.*, 1999). Actualmente, se desconoce la función de la amplificación de estos genes en la patología del neuroblastoma.

Por otro lado, los análisis de secuenciación de DNA no revelaron mutaciones en la secuencia codificante de *MMYC* (Stanton *et al.*, 1986), por lo que la amplificación conlleva una elevación de los niveles basales de la proteína, que, por sí sola, ha demostrado tener una actividad transformante tanto en humanos (Schweigerer *et al.*, 1990) como en roedores (Schwab *et al.*, 1985). Diversas evidencias sugieren que todas las copias del gen amplificado son transcripcionalmente activas (Lutz and Schwab 1997), lo que explicaría los elevados niveles de mRNA de *MMYC* en las células que poseen la amplificación del oncogen. La traducción del mRNA genera grandes cantidades de la fosfoproteína nuclear N-Myc, que forma complejos *in vivo* con otras proteínas que actúan sobre la transcripción (Wenzel *et al.*, 1991).

Existen diferentes teorías que explican el proceso de amplificación. Sin embargo, las características particulares de la forma de presentarse la amplificación de *MYC* apuntan a que el factor desencadenante podría ser la reparación durante la replicación. Este proceso puede desencadenar la duplicación de una región de DNA alrededor de *MYC*, de manera que la copia puede escindirse y multiplicarse extracromosómicamente, generándose así las DMs. Alternativamente, podría integrarse en el DNA en un locus cromosómico cualquiera, desestabilizando la región y provocando un proceso de amplificación intracromosómica, que originaría las HSRs (Schwab *et al.*, 2003).

Las células de neuroblastoma que no presentan amplificación de *MYC* pueden presentar más de una copia del gen, ya que éste puede estar duplicado en 2p24. Aún no está claro si la duplicación es el prelude de la amplificación o la ruta alternativa para activar su potencial oncogénico. La frecuencia en la que estas duplicaciones puedan tener lugar aún no se ha estudiado con detalle, por lo que sus consecuencias en la estabilidad genómica podrían haber sido subestimadas. De hecho, existen varios estudios que relacionan la duplicación de material génico con el desarrollo de diversas patologías (Gratacos *et al.*, 2001; Savelyeva *et al.*, 2001).

El descubrimiento de la amplificación de *MYC*, constituyó la primera evidencia de la existencia de una relación directa, entre la amplificación de un oncogen (en este caso de *MYC*), con la agresividad del crecimiento tumoral (Schwab *et al.*, 1984; Seeger *et al.*, 1985). La amplificación de *MYC*, se observa en tumores avanzados y se asocia a progresión tumoral y mal pronóstico, independientemente de la edad del niño o del estadio del tumor (Schwab 2004). Los pacientes que presentan neuroblastomas localizados (estadios 1, 2 y 3) y los que padecen el neuroblastoma 4S tienen un peor

pronóstico si existe amplificación de *MMYC*, en cambio este marcador no posee un valor pronóstico tan importante en neuroblastomas en estadio 4 (Mora *et al.*, 2002).

1.2 Tratamiento de los neuroblastomas.

Actualmente, se utiliza una estrategia basada en el empleo de múltiples terapias, donde la intensidad se basa en la clasificación internacional de los neuroblastomas en función de grupos de riesgo (Tabla I-I). Ésta estratifica los pacientes en función de varios parámetros: edad en el diagnóstico, estadio de la enfermedad, características biológicas como la amplificación de *MMYC*, la histopatología y el contenido de DNA (DI).

Estadio	Riesgo bajo	Riesgo intermedio	Alto riesgo
1	Todos	Ninguno	Ninguno
2a, 2b	Edad < 1 año, ó entre 1-21 años sin AMP <i>MMYC</i> , ó entre 1-21 años con AMP de <i>MMYC</i> + HF	Ninguno	Edad entre 1-21 años y AMP de <i>MMYC</i> + HD
3	Ninguno	Edad < 1 año y sin AMP de <i>MMYC</i> , o entre 1-21 años y sin AMP de <i>MMYC</i> + HF	Edad entre 0-21 años y con AMP de <i>MMYC</i> ó entre 1-21 años y sin AMP de <i>MMYC</i> + HD
4	Ninguno	Edad < 1 año y sin AMP de <i>MMYC</i>	Edad < 1 año y con AMP <i>MMYC</i> ó entre 1-21 años
4S	Sin AMP de <i>MMYC</i> , HF, DI > 1	Sin AMP de <i>MMYC</i> , HD, DI =1	Con AMP de <i>MMYC</i>

Tabla I-I Grupos de riesgo de neuroblastomas basados en características clínicas y biológicas. AMP: amplificación; DI: índice de DNA; HF: histología favorable; HD: histología desfavorable (Brodeur 2003).

Así entre los posibles tratamientos se incluyen desde la simple observación de la evolución del tumor hasta la cirugía junto con múltiples agentes quimioterápicos y el trasplante de células madre.

Hasta ahora la terapia empleada en los pacientes clasificados en los grupos de riesgo bajo e intermedio muestra ser altamente efectiva. Sin embargo, todavía no existe un tratamiento eficaz para los casos refractarios dentro de los pacientes pertenecientes al grupo de alto riesgo. Se espera que a medida que se avanza en el conocimiento de la patogénesis de la enfermedad sea posible la utilización de terapias con base biológica, cuyas dianas sean no sólo rutas comunes a otros cánceres sino específicas de los neuroblastomas. A continuación, se enumeran algunos de los procesos biológicos que actualmente se consideran como posibles dianas en el desarrollo de nuevas terapias antitumorales.

a)- Inducción del proceso de diferenciación

Uno de los más potentes inductores de la diferenciación de los neuroblastomas humanos *in vitro* es el ácido retinoico (RA). Diversos estudios han demostrado que tanto el ácido *trans*-retinoico como el ácido 13-*cis*-retinoico provocan la parada del crecimiento celular y la diferenciación morfológica de las líneas celulares de neuroblastoma y reducen drásticamente la expresión génica de *NMYC* (Sidell *et al.*, 1983; Thiele *et al.*, 1985; Reynolds *et al.*, 1991; Reynolds *et al.*, 1994).

Ensayos clínicos en fase I han demostrado que el tratamiento de pacientes con neuroblastoma con el derivado sintético ácido 13-*cis*-retinoico da lugar a mayores y sostenidas concentraciones sanguíneas en comparación a la administración de ácido *trans*-retinoico (Reynolds *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1992; Villablanca *et al.*, 1995; Khan *et al.*, 1996). Ensayos clínicos en fase III demostraron posteriormente que la terapia con ácido 13-*cis*-retinoico administrada tras la quimiorradioterapia mejoraba

significativamente la supervivencia de los pacientes con neuroblastoma de alto riesgo (Matthay *et al.*, 1999).

Debido a la relevancia del papel del RA no solo como agente inductor de la diferenciación de los neuroblastomas sino como importante morfógeno involucrado en el desarrollo normal del sistema nervioso, se hablará posteriormente con detalle sobre su mecanismo de acción

b) Otros:

- Inducción de la apoptosis: El tratamiento con el retinide sintético, fenretinida – N-(4-hidroxifenil)retinamida, agente citotóxico, desencadena apoptosis y necrosis en neuroblastomas *in vitro*. (Maurer *et al.*, 1999).

- Inhibidores de los receptores Trk: El bloqueo de los receptores Trk puede contribuir a reducir la resistencia y promover la apoptosis de los neuroblastomas de alto riesgo, que expresan TrkB y presentan amplificación de *NMYC* (Evans *et al.*, 1999; Ho *et al.*, 2002).

- Inhibidores de la angiogénesis constituyen una terapia prometedora, ya que el grado de neovascularización se correlaciona con el desarrollo de metástasis y mal pronóstico, además de estar asociada a la amplificación de *NMYC* (Meitar *et al.*, 1996).

- La inmunoterapia frente al disialogangliosido G_{D2}, expresado abundantemente en la mayoría de los neuroblastomas (Cheung *et al.*, 1998).

- Los agentes marcados radiactivamente, como la ¹³¹I-MIBG (meta-yodobencilguanidina marcada con I¹³¹), han demostrado su eficiencia en los casos de neuroblastoma refractarios a otros tratamientos (Kang *et al.*, 2003).

2. EL ÁCIDO RETINOICO

2.1 Metabolismo y mecanismo de acción del ácido retinoico.

El ácido retinoico (RA) es el compuesto más activo de los derivados de la vitamina A (trans-retinol), que pertenece a la familia de los retinoides. Se trata de una molécula lipofílica, de bajo peso molecular, que presenta cierta solubilidad en fluidos acuosos como el plasma, lo que le confiere la capacidad de difundir eficazmente a través de disoluciones acuosas, así como a través de membranas hidrofóbicas, actuando como un perfecto morfógeno.

Los mamíferos son incapaces de sintetizar vitamina A *de novo*. La vitamina A o retinol se incorpora en el organismo por la ingesta tanto de productos de origen animal, en forma de retinol y de ésteres de retinol, como de origen vegetal en forma de carotenoides. Los ésteres de retinol se hidrolizan en el lumen del intestino delgado a retinol, el cual es emulsionado con sales biliares y ácidos grasos libres y captado por los enterocitos. Por otro lado los carotenoides, entre los que destaca el β -caroteno como más activo, se absorben por difusión pasiva en el interior del enterocito donde se convierten en retinol.

Los ésteres de retinilo se acumulan en diferentes órganos como son el hígado, los pulmones, la médula ósea y los riñones (Blomhoff and Blomhoff 2006). Desde estos depósitos se libera retinol, que viaja por el torrente circulatorio unido a la proteína de unión al retinol (RBP4). Tras la interacción con el receptor STRA6 (Kawaguchi *et al.*, 2007) entra en las células y, una vez en el citosol, se une a RBP1 y es metabolizado a ácido *trans*-retinoico mediante dos reacciones de oxidación. La primera oxidación, de retinol a retinal, es reversible y está catalizada por las retinol o alcohol deshidrogenadas,

que es el paso limitante. El retinaldehído entonces es convertido a su forma activa, el RA, por las aldehído deshidrogenasas (ALDH), siendo la RALDH2, la más importante durante el desarrollo embrionario (Maden 2002). Mientras que la primera etapa de conversión del retinol hacia retinal es ubicua, la etapa de la formación del RA a partir del retinal está restringida a ciertos tejidos que expresan el enzima. Es en estos tejidos y en los circundantes en los que actuará el RA.

En el citosol, enzimas de la familia citocromo P450, CYP26A1, CYP26B1 y CYP26C1, metabolizan el RA a formas inactivas y susceptibles de degradación (Reijntjes *et al.*, 2004).

El RA entra en el núcleo a través de su interacción con CRABP-II (Budhu and Noy 2002). El RA actúa fundamentalmente modificando a nivel transcripcional la expresión de sus genes diana, a través de la activación de los factores de transcripción dependientes de ligando, los receptores de ácido retinoico. Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares y se clasifican en dos subfamilias: los receptores de RA (RARs) y los receptores de retinoide X (RXRs). Se han descrito tres tipos de receptores RARs, RAR α , RAR β , RAR γ , y tres tipos de receptores RXRs, RXR α , RXR β , RXR γ (Mark *et al.*, 2006). El ácido retinoico todo-*trans* es el ligando natural para el receptor RAR y el ácido retinoico 9-*cis* es el ligando natural del receptor RXR (Mark *et al.*, 2006).

Los RARs y los RXRs actúan formando heterodímeros (RAR/RXR) que reconocen secuencias consenso conocidas como elementos de respuesta al ácido retinoico (RARE). Estas secuencias están formadas por dos repeticiones directas, con una secuencia (A/G)G(G/T)TCA, separadas por cinco nucleótidos, aunque también pueden encontrarse a uno o dos nucleótidos de distancia, en este último caso se ha

descrito que se produce la unión del homodímero RXR/RXR (Bastien and Rochette-Egly 2004).

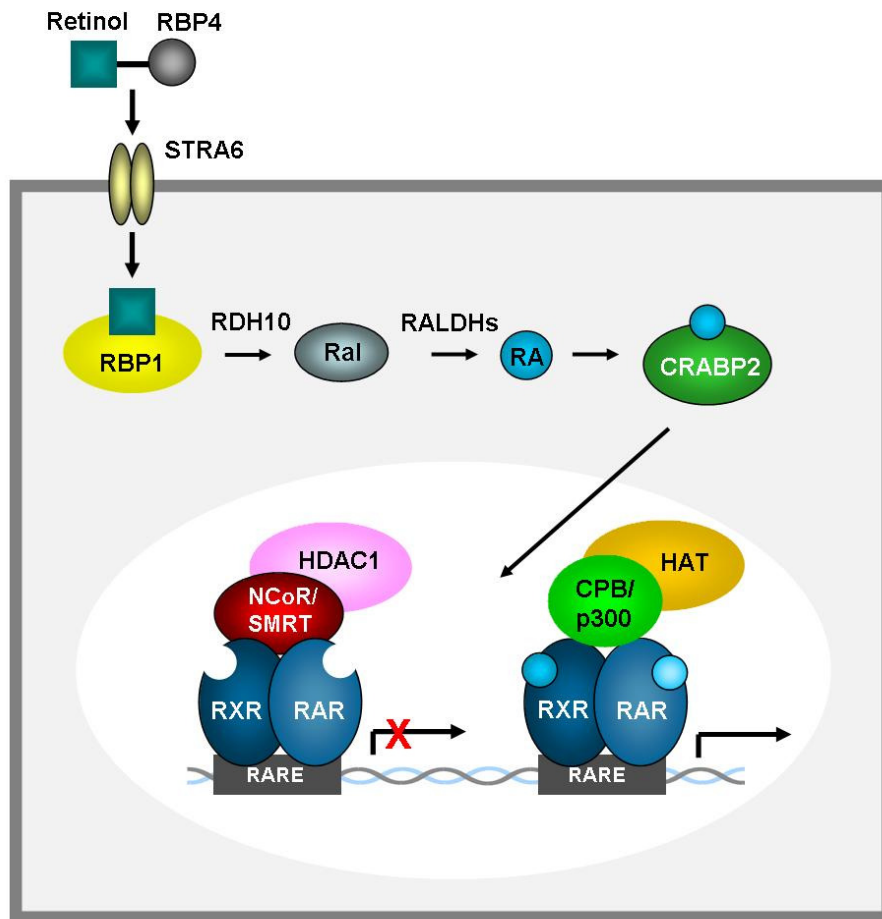


Figura 1-I. Rutas implicadas en la generación del RA y su mecanismo de acción. El retinol se transporta en el plasma unido a la RBP4. Las células lo captan a través de la interacción de RBP4 con el receptor STRA6. Dentro de la célula el retinol es metabolizado por la RDH10 (retinol deshidrogenasa 10) a Ral (retinaldehído), el cual a su vez es metabolizado a RA (ácido *trans*-retinoico) por las RALDHs (retinaldehído deshidrogenasas). El RA se une entonces a CRABP2 (proteína de unión al ácido retinoico 2) y es transportado al núcleo, donde interacciona con los RARs (receptores de ácido retinoico) y los RXRs (receptores de retinoide X). En ausencia de RA, estos receptores forman heterodímeros que están unidos a los RARE (elementos de respuesta al ácido retinoico), presentes en la secuencia promotora de los genes diana. Sin embargo, están asociados a co-represores que, a su vez, unen complejos con actividad HDAC (histona deacetilasa), reprimiendo así la transcripción. La unión del RA a sus receptores desencadena la disociación de los co-represores y la reclutación de co-activadores asociados a complejos con actividad HAT (histona acetiltransferasa) lo que permite la posterior iniciación de la transcripción. Modificada a partir de (Bastien and Rochette-Egly 2004; Maden 2007).

Así, en ausencia de RA los heterodímeros RAR/RXR interactúan con co-represores entre los que se encuentran N-CoR y SMRT, los cuales a su vez unen la proteína adaptadora mSin3 y proteínas con actividad histona desacetilasa para reprimir la transcripción. En cambio, cuando el RA se une al RAR se produce un cambio conformacional en la proteína que libera los co-represores del heterodímero y facilita la unión del ácido 9-*cis*-retinoico al RXR. Asimismo, el co-regulador CBP/p300 entra a formar parte del complejo y recluta a la proteína coactivadora ACTR, con actividad histona acetiltransferasa, promoviéndose finalmente la transcripción (Reynolds *et al.*, 2003) (Fig. 1-I).

Los RAREs han sido localizados inequívocamente en 27 genes. Sin embargo, se ha observado que más de 500 genes son modulados por la acción del RA bien directamente a través de los RAREs o a través de otros mecanismos independientes (Balmer and Blomhoff 2002).

Entre los efectos del complejo RA-RAR/RXR independientes de la unión a las RAREs se encuentra la transrepresión de la proteína activante (AP-1), un factor de transcripción heterodimérico compuesto por proteínas relacionadas con fos y jun. La transrepresión está mediada por la inhibición de la unión de c-jun al DNA y el secuestro de CBP/p300, lo que limita su disponibilidad para su posterior unión a AP-1 (Schule *et al.*, 1991; Kamei *et al.*, 1996). Este efecto podría estar asociado a la actividad antineoplásica de los derivados de la vitamina A o retinoides. También se ha observado que el complejo es capaz de actuar sobre la respuesta inflamatoria, mediante la regulación de los niveles del factor de transcripción nuclear NF- κ B (Kuenzli *et al.*, 2004).

Asimismo, el RA ha mostrado tener efectos a través de mecanismos no genómicos. Entre éstos, se ha descrito la modulación de la actividad de la isoenzima α

de la proteína quinasa C (PKC α) mediante unión directa con retinoides (Ochoa *et al.*, 2003). Además, el RA es capaz de desencadenar, rápida y específicamente, la liberación espontánea de acetilcolina en las sinapsis neuromusculares en *Xenopus laevis* (Liao *et al.*, 2004).

Finalmente, se ha observado que el RA es capaz de unirse a distintas proteínas reguladoras de forma covalente mediante enlaces tioéster. A pesar de que el número de proteínas modificadas por este mecanismo es pequeño, incluye importantes proteínas como las subunidades reguladoras de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico, citoqueratinas y la ribonucleótido reductasa (Takahashi *et al.*, 1995; Genchi and Olson 2001).

2.2 Función del RA en el desarrollo del sistema nervioso.

La vitamina A y sus derivados (los retinoides) son esenciales para el desarrollo embrionario, así como para la homeostasis en el organismo adulto (Mey and McCaffery 2004; Lane and Bailey 2005). En el desarrollo del sistema nervioso, el RA interviene en dos procesos fundamentales: morfogénesis y diferenciación neuronal.

En el primer caso, el RA participa en el modelaje de las zonas anteroposterior y dorsoventral, tanto en la placa como en el tubo neural. En el eje anteroposterior de la placa neural, el RA, junto con WNTs y FGFs (factores de crecimiento fibroblástico) es esencial en la organización del telencéfalo posterior y la médula espinal anterior. El déficit de vitamina A resulta en la desaparición del telencéfalo posterior y la formación de una médula espinal anterior anómala (Maden 2002).

En el eje dorsoventral del tubo neural en desarrollo, el RA, junto con otras moléculas, participa en la organización anatómica y la especificación de los

neuroblastos que darán lugar a las motoneuronas y los distintos tipos de neuronas dorsales y ventrales de la médula espinal. Así, el RA es producido por las somitas en la región paraaxial del mesodermo, y difunde al tubo neural donde reprime la actividad de FGF, liberado desde la región caudal del mesodermo, e induce la expresión de un grupo de genes. Por otra parte, la SHH (sonic hedgehog), sintetizada por la notocorda y las células de la región ventral del tubo neural, induce la expresión ventral de otro tipo de genes. Finalmente, las BMPs (proteínas morfogénicas óseas) liberadas desde las células de la región dorsal del tubo neural, inducen los genes dorsales y los tipos de neuronas dorsales (Wilson and Maden 2005; Maden 2007).

La segunda función esencial del RA en el desarrollo del sistema nervioso es la regulación de la diferenciación neuronal (Maden 2002; Appel and Eisen 2003; Diez del Corral and Storey 2004). La diferenciación es un proceso que comprende cambios en la expresión de genes implicados tanto en diferenciación como en proliferación. Así, por un lado, el RA induce la neuritogénesis o la formación de extensiones a partir del cuerpo celular en cultivos primarios de neuronas (Rodríguez-Tebar and Rohrer 1991; Ved and Pieringer 1993; Plum *et al.*, 2001). Estas neuritas sirven como precursores de axones y dendritas, que una vez formados, ayudan a polarizar la neurona. Por otro lado, el RA es capaz de diferenciar hacia fenotipo neuronal algunas líneas celulares establecidas de carcinoma embrionario (Jones-Villeneuve *et al.*, 1982; Edwards and McBurney 1983), lo que le convierte en una posible diana terapéutica en cáncer.

2.3 Mecanismos de regulación de la diferenciación por RA en líneas de neuroblastoma.

El empleo de líneas celulares de neuroblastoma humano en el estudio de la diferenciación neuronal inducida por RA ha resultado ser muy útil, debido a su origen en la cresta neural y a sus características neuroblásticas. La cresta neural de los vertebrados es una estructura temporal, de origen ectodérmico, que se desarrolla a la vez que se cierra el tubo neural. Su capacidad migratoria y posterior distribución durante el desarrollo es un punto básico en el desarrollo embrionario general y de la mayoría de órganos y estructuras en particular. Las células crestoneurales migran desde la región más dorsal del tubo neural a lo largo de la vía ventromedial o de la dorsolateral. En el primer caso, dan lugar a las células de los ganglios sensitivos y del sistema nervioso autónomo, así como a la médula adrenal. En el segundo caso, las células se diferencian a células pigmentarias. Además las células originarias de la cresta neural pueden dar lugar el tejido esquelético y conectivo de la cabeza y la cara y a las meninges (Bronner-Fraser 1994).

La mayoría de las líneas celulares de neuroblastoma presentan una población heterogénea formada por tres tipos celulares: neuroblástico (N), células planas o adherentes al sustrato (S) y células intermedias (I). El empleo de marcadores bioquímicos permite distinguir dichas poblaciones. Así, las células tipo N e I se observó que expresaban proteínas del neurofilamento, mientras que las de tipo I y S eran positivas para vimentina. Además, las células adherentes tipo S sintetizan colágeno y fibronectina, de manera similar a como lo hacen las células de Schwan. Por ello, se propuso que las células tipo N se asemejaban a los simpatoblastos embrionarios, las de tipo S serían semejantes a las células de Schwan, a los

progenitores gliales o melanocíticos o las células derivadas del mesénquimo, y las tipo I tendrían un fenotipo intermedio, con potencial para diferenciar hacia los dos tipos celulares anteriores (Thiele 1998).

El RA induce la diferenciación morfológica y bioquímica en las células de tipo N. La exposición de las células a concentraciones fisiológicas de RA produce tanto el incremento en el número de células que desarrollan neuritas, así como la longitud de estas, como la inhibición de la proliferación celular (Sidell *et al.*, 1983; Thiele *et al.*, 1985).

Existen diversos mecanismos a través de los cuales se ha postulado que el RA podría inducir el proceso de diferenciación, que se describen a continuación.

2.3.1- Regulación de los niveles de los receptores de neurotrofinas.

En cultivos primarios de neuronas simpáticas de embriones de pollo se ha observado que el RA incrementa la transcripción de los receptores TrkA y p75^{NTR}, lo que permite que las neuronas inmaduras respondan al factor de crecimiento nervioso (NGF) como ocurre *in vivo* (Plum *et al.*, 2001). Sin embargo, este efecto no se ha observado en neuroblastos simpáticos procedentes de embriones de rata (Wyatt *et al.*, 1999).

En líneas celulares de neuroblastoma también se ha observado una inducción de los niveles, tanto de mRNA como de proteína, de los receptores Trk. Así, concentraciones nanomolares de RA incrementa los niveles de mRNA del receptor TrkB, así como de su forma truncada, en la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y (Encinas *et al.*, 2000). El tratamiento posterior con factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) da lugar a la diferenciación de las células SH-SY5Y a células con un

fenotipo claramente neuronal (Encinas *et al.*, 2000; Almeida *et al.*, 2005). En la línea de neuroblastoma SMS-KCNR, que expresa BDNF de forma constitutiva, el tratamiento con RA también induce la síntesis de TrkB, así como la diferenciación neuronal de esta línea celular incluso en ausencia de neurotrofinas (Lucarelli *et al.*, 1995).

2.3.2- Activación de proteínas quinasas.

El RA es capaz de inducir la activación de cascadas de señalización mediadas por quinasas reguladas extracelularmente (ERK1/2), la quinasa amino-terminal de c-Jun (JNK) y la fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K).

La activación de la cascada mediada por ERK es esencial en el desarrollo de neuritas inducido por RA en la línea celular SK-N-BE(2)C (Lee and Kim 2004), pero no así en la línea celular SH-SY5Y (Miloso *et al.*, 2004). Sin embargo, en ésta la inhibición de la cascada de señalización desencadenada por JNK1 actúa reprimiendo el crecimiento de neuritas inducido por RA (Yu *et al.*, 2003). Dicho efecto se ha observado también en esta línea celular al ser sometida a inhibidores de PI3K (Pan *et al.*, 2005). Así, en células de neuroblastoma SH-SY5Y, el RA induce la activación de Rac1 y proteína quinasa asociada a mitógeno (MAPK) a través de la vía PI3K, mecanismo implicado en la diferenciación neuronal (Pan *et al.*, 2005).

2.3.3- Regulación génica mediada por RA.

El RA modula, directa o indirectamente, la expresión de un numeroso grupo de mRNAs y/o proteínas involucradas en el crecimiento de neuritas. Entre otras, cabe destacar la proteína asociada a los microtúbulos (MAP2), marcador de crecimiento

dendrítico. La expresión de su mRNA y proteína es únicamente detectable en las células de carcinoma embrionario P19 expuestas a RA. La inhibición de su expresión mediante tecnología antisentido no sólo reduce la población celular que desarrolla neuritas sino que, además, disminuye la extensión de las mismas. Así mismo, el descenso en la expresión de Map2 afecta al cese de la proliferación celular ejercido por el RA (Dinsmore and Solomon 1991).

2.3.4- Regulación del ciclo celular por RA

Uno de los principales efectos biológicos del RA es la inhibición de la progresión del ciclo celular. De hecho, la conexión existente entre la vitamina A y el desarrollo de cancer fue establecida poco después del descubrimiento de esta vitamina y su estructura química. Sin embargo, no fue hasta los años 60 cuando se demostró que la deficiencia de vitamina A incrementaba el desarrollo de tumores, espontáneos e inducidos, en animales (Saffiotti *et al.*, 1967).

Otro hallazgo importante llegó de la mano de Strickland y Mahdavi, quienes pusieron de manifiesto la capacidad del RA de inducir la diferenciación de las células de teratocarcinoma *in vitro* e *in vivo* (Strickland and Mahdavi 1978). Un estudio posterior de Lotan y Nicholson estableció que el RA inhibía el crecimiento de un gran número de células tumorales en cultivo (Lotan and Nicholson 1977). Actualmente, se sabe que el RA actúa deteniendo la progresión del ciclo celular ejerciendo su regulación en la fase G1. En concreto, son varios los trabajos que describen el incremento en los niveles del inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas (CKI), p27, como uno de los posibles mecanismos involucrados en el efecto antiproliferativo del RA. Dicho efecto no se produce a través de la inducción de la expresión génica de

p27, sino que es consecuencia de una disminución en su degradación (Matsuo and Thiele 1998; Nakamura *et al.*, 2003).

En el caso del desarrollo la corteza cerebral, p27 tiene un papel clave en la coordinación de la salida del ciclo celular, la diferenciación neuronal y la migración radial (Nguyen *et al.*, 2006). Además, en células de carcinoma embrionario y de neuroblastoma se ha observado que la diferenciación neuronal inducida por RA requiere el incremento de los niveles proteicos de p27 (Baldassarre *et al.*, 2000; Borriello *et al.*, 2000; Borriello *et al.*, 2006). Por tanto, los mecanismos reguladores de su expresión proteica podrían estar involucrados en la diferenciación y en el desarrollo de cáncer. Es por ello que a continuación resumiremos la regulación del ciclo celular, centrándonos principalmente en la fase M y la transición entre las fases G1 y S.

3. EL CICLO CELULAR.

3.1 Regulación de la progresión del ciclo celular.

La desregulación del ciclo celular es un aspecto fundamental en el cáncer. Mientras que las células normales proliferan en respuesta a señales mitógenas, la proliferación de las células cancerosas es consecuencia de defectos en las señales externas que estimulan o inhiben este proceso.

El esquema molecular del control de un ciclo celular consiste en proteínas quinasas que promueven la progresión a través de cada fase del ciclo celular, las Cdk (ciclina dependientes de quinasas). Cada Cdk es dependiente de una ciclina particular, cuya disponibilidad controla la actividad de cada quinasas. De los múltiples

loci que codifican Cdks y ciclinas, presentes en las células humanas (Malumbres and Barbacid 2005), sólo un determinado subgrupo de complejos ciclina-Cdk está involucrado en la progresión del ciclo celular. En este subgrupo se incluyen las tres Cdks de interfase (Cdk2, Cdk4 y Cdk6), y la Cdk mitótica Cdk1, también denominada Cdc2 (“cell division control protein 2”) y diez ciclinas pertenecientes a cuatro clases distintas (las de tipo A, B, D y E) (Malumbres and Barbacid 2009).

Además, la actividad de las Cdks está controlada por la unión de CKIs, (inhibidores de Cdk), de los que se han caracterizado dos familias. Los miembros de la familia Ink4 (p15, p16, p18 y p20) inhiben la actividad de Cdk4 y Cdk6, mientras que los miembros de la familia Kip/Cip (p21, p27 y p57) inhiben, fundamentalmente, la actividad de Cdk2 (Bloom and Pagano 2003).

Los niveles de expresión de ciclinas durante la división celular son periódicos (Evans *et al.*, 1983). Esto es resultado de un proceso constante de síntesis acoplado a la proteólisis que tiene lugar durante un espacio de tiempo determinado en el ciclo celular, ejecutado por el UPS (sistema de ubiquitinación por el proteasoma) (Glotzer *et al.*, 1991). Los CKIs, por su parte, son también marcados para su degradación por el UPS. Por tanto, el ciclo celular está predominantemente regulado por dos tipos de modificaciones post-traduccionales: la fosforilación y la ubiquitinación (Nakayama and Nakayama 2006).

El UPS conlleva 2 pasos. Primero tiene lugar la unión covalente de múltiples moléculas de ubiquitina a la proteína sustrato, para que, posteriormente, se produzca su degradación por el complejo 26S del proteasoma (Hershko 1983). El paso inicial está mediado al menos por 3 enzimas: una enzima activante de la ubiquitina (E1), una enzima conjugante (E2) y una ubiquitina ligasa (E3). La E1 forma un enlace tioéster

entre una cisteína del centro activo y un residuo de glicina en el extremo carboxilo terminal de la ubiquitina. Es entonces cuando la ubiquitina activada se transfiere a la E2 mediante formación de un nuevo enlace tioéster con un residuo de cisteína del centro activo. Finalmente, la E3 transfiere el polipéptido de ubiquitina desde la E2 a un grupo ϵ -amino de un residuo de lisina del sustrato. (Castro *et al.*, 2005).

3.1.1 Las E3 ubiquitina ligasas del ciclo celular: SCF y APC/C

El complejo SCF (Skp1/cullin/F box proteins) está formado por tres componentes constantes y uno variable. Dentro de los primeros se incluyen: RBX1 (proteína con un motivo estructural del tipo dedo-RING), CUL1 (proteína de anclaje) y SKP1 (proteína adaptadora). El segundo tipo de componentes es una proteína con un motivo F-box, a través del cual interacciona con SKP1 y que se encarga del reconocimiento del sustrato. Dentro de las proteínas F-box, hay tres que están implicadas en el control del ciclo celular, Skp2, Fbw7 y β -TrCPE (β -transducin repeat containing protein, proteína que contiene repeticiones de β -transducina) (Nakayama and Nakayama 2006).

El complejo APC/C (anaphase promoting complex, complejo promotor de la anafase o ciclosoma). Estructuralmente es similar al complejo SCF. Los componentes constantes lo constituyen: APC 11 (proteína con un motivo estructural del tipo dedo-RING relacionada con RBX1), APC 2 (proteína de anclaje relacionada con CUL1) y al menos 11 subunidades más cuya composición y función aún no está claramente establecida (Apc10/Doc1, proteínas con un motivo tetratricopéptido, Apc4, Apc5, Apc 13 y Cdc 26). La parte variable de su estructura es el activador. Existen 2 posibles activadores de APC/C: Cdc20 (cell division cycle 20) y Cdh1, también conocida como

Hct1. Ambas proteínas confieren especificidad de sustrato de manera equivalente a la proteína F-box en el complejo SCF (Baker *et al.*, 2007).

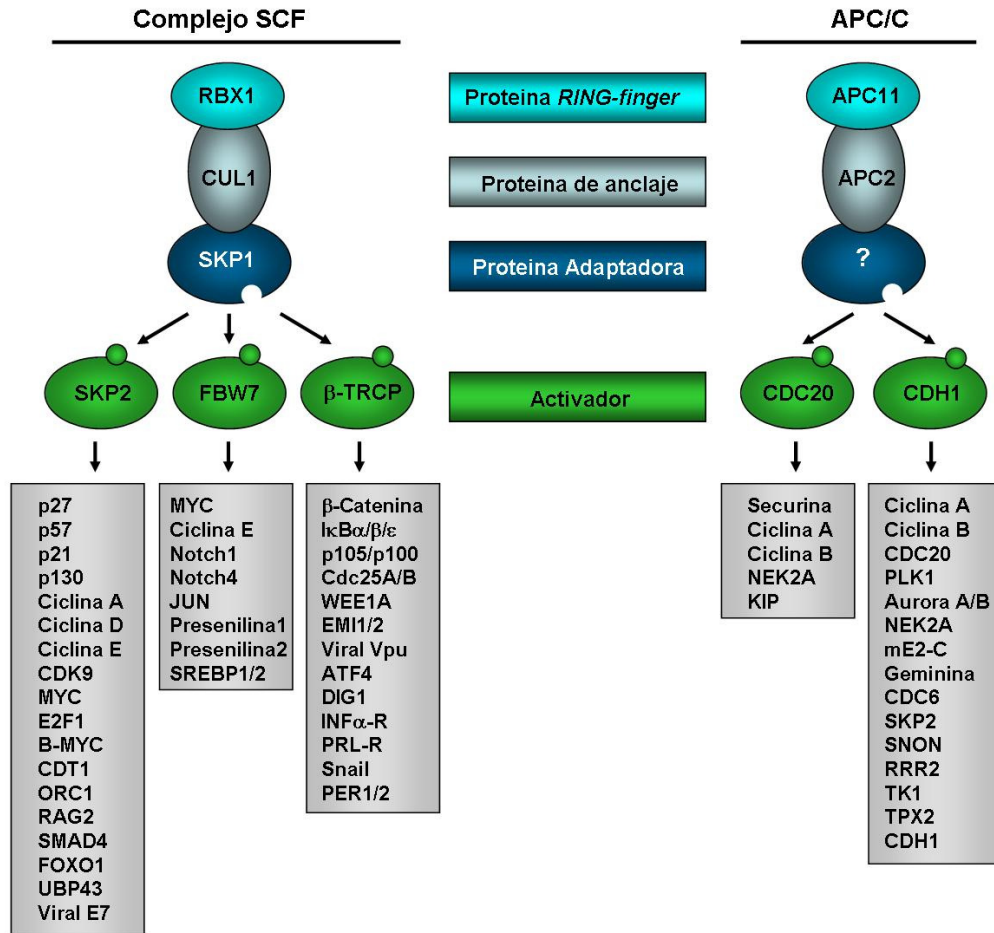


Figura 2-l. Similitud estructural entre el complejo SCF y APC/C. Ambos complejos están constituidos por subunidades constantes y subunidades variables de reconocimiento de sustrato. Los componentes constantes que forman parte del complejo SCF son RBX1 (con dominio RING-finger), CUL1 (proteína de anclaje) y SKP1 (proteína adaptadora). El componente variable es una proteína con un dominio F-box. En humanos están descritas más de 70 proteínas F-box de las cuales sólo tres participan en el control del ciclo celular: Skp2 (S-phase kinase associated protein 2, proteína 2 asociada a las quinasas de fase S), Fbw7 (F-box and WD-40 domain protein, proteína con dominios F-box y WD-40) y β-TrCP (β-transducin repeat-containing protein, proteína que contiene repeticiones de β-transducina). Los constituyentes constantes de APC/C son APC1 (proteína con dominio finger-RING), APC2 (proteína de anclaje relacionada con CUL1) y otros 11 componentes más. También posee una subunidad activadora variable, Cdc20 (cell division cycle) o Cdh1 (también conocida como Hct1), ambas confieren especificidad de sustrato. Se muestran los sustratos conocidos de cada subunidad variable. Modificada de (Nakayama and Nakayama 2006).

A pesar de su similitud estructural y bioquímica, cada complejo desempeña funciones distintas (Fig. 2-1). Así, el complejo APC/C actúa desde la anafase hasta el final de la fase G1 del ciclo celular. Sin embargo, el complejo SCF es activo desde el final de la fase G1 hasta el comienzo de la mitosis. Sus funciones exactas no están claramente delimitadas, incluso existen evidencias de intercomunicación entre ambos complejos enzimáticos (Guardavaccaro *et al.*, 2003; Bashir *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2004).

3.2. Fase M del ciclo celular

Durante la mitosis, se produce la segregación de las cromátidas hermanas y la citoquinesis. La mitosis está dividida en 5 fases: profase, prometafase, metafase, anafase (A y B) y telofase.

La regulación de la progresión de la fase M recae, predominantemente, en dos mecanismos post-transcripcionales mencionados anteriormente: la fosforilación y la proteólisis. Entre ambos se produce un control recíproco. La maquinaria proteolítica es controlada por fosforilación, mientras que la actividad de varias Cdk's mitóticas se ve disminuida por el proceso de degradación. La E3 ubiquitina ligasa encargada de la progresión y salida de mitosis es APC/C (Peters 2002).

Así mismo, se ha descrito la existencia de mecanismos de supervivencia celular, los denominados checkpoints o puntos de control. Estos monitorizan el transcurso de la fase M en varios niveles. El punto de control de la estructura del DNA detiene el ciclo celular en la transición entre las fases G2/M en respuesta a DNA no replicado o dañado. Mientras que el punto de control del ensamblaje del huso mitótico

(SAC, spindle assembly checkpoint) previene el comienzo de la anafase cuando los cinetocoros no muestren una adecuada unión al huso mitótico (Burke 2000).

3.2.1 APC/C en mitosis

Durante la profase la fosforilación de las subunidades con un motivo tetra-tricopéptido por el complejo ciclina B1/Cdk1 dirige la unión de Cdc20 al complejo APC/C. Plk1 (Polo-like kinase 1, quinasa similar a Polo 1) actúa sinérgicamente junto con el complejo ciclina B1/Cdk1 (Kraft *et al.*, 2003), mientras que la actividad de PKA (Protein kinase A, proteína quinasa A) inhibe la destrucción de la ciclina B1 por APC/C (Kotani *et al.*, 1998). Cdh1 también resulta fosforilado por el complejo ciclina B1/Cdk1 lo que previene su asociación a APC/C (Kramer *et al.*, 2000). El complejo APC/C-Cdc20 es inhibido por la unión de Emi1, que es degradado posteriormente durante la profase (Miller *et al.*, 2006).

Así, el complejo APC/C-Cdc20 activo se encarga de la degradación de la ciclina A (Geley *et al.*, 2001), el factor de transcripción HoxC10 (Gabellini *et al.*, 2003) y la quinasa Nek2A (Hames *et al.*, 2001) durante la prometafase.

Para que tenga lugar la transición de metafase a anafase, tiene que producirse la degradación de varios sustratos clave, entre los que se incluyen la securina y la ciclina B1. El comienzo de la anafase está marcado por la degradación de la cohesina, un complejo multiproteico que mantiene la unión entre las cromátidas hermanas. La separasa, una cisteín-proteasa, degrada la cohesina (Uhlmann *et al.*, 1999). Su activación está cuidadosamente controlada y no se produce hasta que no tiene lugar la correcta orientación de los cromosomas en el huso mitótico. Existen dos mecanismos de inhibición del proceso: la unión de la securina a la separasa y la fosforilación de

ésta por el complejo ciclinaB1/Cdk1 (Zou *et al.*, 1999). Sin embargo, existen evidencias de que la unión de la ciclina B1 a la separasa tiene un efecto inhibitor, sin necesidad de la actividad quinásica de Cdk1 (Holland and Taylor 2006).

Hasta hace poco tiempo se pensaba que la proteólisis tanto de la securina como de la ciclina B1 eran únicamente controladas por el complejo APC/C-Cdc20. Sin embargo, recientemente se ha descrito que la activación prematura de este complejo desencadena una degradación precoz de la ciclina B1 pero no de la securina. Por el contrario, la activación anticipada del complejo APC/C-Cdh1 anticipa la degradación de la securina pero no de la ciclina mitótica (Jeganathan *et al.*, 2005; Jeganathan *et al.*, 2006). Por tanto, el complejo APC/C-Cdh1 desempeña un papel crítico en la mitosis, mucho antes de lo que se había pensado inicialmente.

Una vez que se han separado las cromátidas hermanas, éstas son translocadas a los polos de la célula por la combinación de dos procesos: el acortamiento de los microtubulos y la activación de las proteínas motoras dependientes de los microtubulos. Así, durante la progresión de la anafase es crítica la actividad de APC/C. Tanto APC/C-Cdc20 como APC/C-Cdh1 son capaces de ubiquitinar la cromoesina kid de *Xenopus* (Xkid) *in vitro* e *in vivo* (Castro *et al.*, 2003). Esta proteína está encargada de generar la fuerza polar de eyección necesaria para que los cromosomas se alinien en la placa metafásica. Su degradación, necesaria para la segregación de los cromosomas, comienza en anafase, y continúa hasta el final de la fase G1 (Castro *et al.*, 2003). Por el contrario, recientes estudios en humanos apuntan que la proteína kid es degradada por APC/C-Cdh1 en fase G1, y no es necesaria para la progresión de la mitosis (Feine *et al.*, 2007). APC/C también interviene en la degradación de proteínas asociadas a los microtubulos, Ase1 y Tpx2,

y las quinesinas Kip1 y Cin8 durante la anafase (Juang *et al.*, 1997; Gordon and Roof 2001; Hildebrandt and Hoyt 2001; Stewart and Fang 2005b).

El comienzo de la actividad de APC/C-Cdh1 a la salida de mitosis parece requerir dos pasos: la disminución de la actividad quinásica del complejo ciclinaB1/Cdk1 y la completa activación de Cdh1 por desfosforilación. La proteína Cdh1 no es necesaria para la salida de mitosis en humanos, en cambio se requiere su participación asociada a APC/C en la degradación ordenada de algunos sustratos mitóticos como Cdc20 y las quinasas Plk1, Aurora A y AuroraB (Lindon and Pines 2004; Stewart and Fang 2005a).

3.3 Mecanismo de acción de APC/C

3.3.1 Asociación de los activadores Cdc20 y Cdh1

La degradación ordenada y específica de sustratos diana de APC/C requiere la unión de uno de sus activadores Cdc20 o Cdh1. La interacción de estas proteínas con APC/C está basada en la unión directa con las subunidades que poseen un motivo TPR, como son Apc3 y Apc7, a través del dominio IR presente en el extremo carboxilo terminal (Vodermaier *et al.*, 2003). Además, existe otra secuencia denominada caja-C (DR(F/Y)IPxR), en el extremo amino terminal que también interviene en la unión con APC/C en levaduras (Schwab *et al.*, 2001).

Tanto Cdc20 como Cdh1 son miembros de la familia de proteínas WD40. Este motivo también está descrito en un subgrupo de las proteínas F-box. Las proteínas F-box contienen dos dominios, uno para el reconocimiento de sustratos y el otro, el dominio F-box, para la asociación con Skp1. Curiosamente, en el subgrupo de

proteínas F-box que poseen el dominio WD40, éste es el que media el reconocimiento de sustratos (Patton *et al.*, 1998). La enorme similitud entre las estructuras de los complejos APC/C y SCF sugiere un papel similar de los activadores en el reconocimiento de sustratos.

3.3.2 Reconocimiento de sustratos

Los sustratos diana de APC/C se unen a cada activador gracias a la presencia de una o varias secuencia de aminoácidos características (ver tabla I-II).

La primera señal de degradación identificada fue la denominada caja de destrucción (D-box, caja D) (Glotzer *et al.*, 1991). Los resultados de Glotzer y col. demostraron que la degradación de las ciclinas dependía de la presencia en el extremo amino terminal de un fragmento de 91 aminoácidos que podía provocar la ubiquitinación y degradación de una proteína no relacionada, cuando ambas eran fusionadas. Un estudio más exhaustivo del extremo amino de las ciclinas reveló la presencia de un motivo corto y conservado de 9 aminoácidos que se denominó caja D, con una secuencia RxxLxxxxN/D/E (Glotzer *et al.*, 1991; King *et al.*, 1996; Geley *et al.*, 2001). Entre los sustratos de APC/C en los que se ha detectado esta señal de destrucción se encuentran la ciclina B1 (Glotzer *et al.*, 1991), la ciclina A (Geley *et al.*, 2001), la securina (Zur and Brandeis 2001), las quinasas Nek2A (Hames *et al.*, 2001) y aurora A (Castro *et al.*, 2002) y el activador de SCF, Skp2 (Wei *et al.*, 2004), entre otros.

Una segunda secuencia de degradación, la denominada caja KEN, fue descrita posteriormente por Pflieger y col. La degradación de Cdc20 dependiente de APC/C-Cdh1 es debida a la presencia de esta nueva secuencia, ya que Cdc 20 carece de caja

D. La caja KEN es también una secuencia transponible, capaz de inducir la proteólisis de una proteína no relacionada a la que se le hayan fusionado su secuencia (Pfleger and Kirschner 2000). Los aminoácidos esenciales que conforman la caja KEN son: KENxxx(N/D/E/S/G) (Harper *et al.*, 2002). Los sustratos que presentan la caja KEN y/o la caja D interactúan específicamente con Cdh1, mientras que Cdc20 se une exclusivamente a los sustratos que poseen caja D (Pfleger and Kirschner 2000).

Una tercera señal de degradación por APC/C-Cdc20 y APC/C-Cdh1 es la caja GxEN, que ha sido identificada en la proteína XKid. La delección de esta secuencia previene la degradación de XKid, y, como las otras secuencias proteolíticas descritas, cuando es fusionada a otra proteína distinta induce su degradación (Castro *et al.*, 2003).

En la quinasa aurora A se ha detectado una secuencia de degradación distinta a las anteriores, denominada DAD (D box activating domain, dominio activador de la caja D) o caja A cuya secuencia consenso es RxLxPSN. Ésta es necesaria para su degradación por APC/C-Cdh1, junto con la caja D (Littlepage and Ruderman 2002). La presencia de dobles motivos de reconocimiento también se ha descrito en otras proteínas como la ciclina A (Geley *et al.*, 2001) y la quinasa Nek2A (Hames *et al.*, 2001). Estos motivos podrían actuar bien como una unidad, siendo necesarios ambos para la degradación, o bien constituir 2 sitios distintos para la unión de cada una de las 2 subunidades de APC/C. Recientemente, se ha observado que la interacción de APC/C con la caja D es dependiente de las fases del ciclo celular en ausencia de Cdh1 y Cdc20 (Yamano *et al.*, 2004), lo que abre la posibilidad de la existencia de un receptor de esta secuencia dentro de las subunidades invariables que constituyen APC/C.

Sustrato	Secuencia de reconocimiento necesaria para su degradación	Comienzo de la degradación	Actividad de APC/C implicada
Ciclina A	Caja D y una secuencia próxima de 12 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal	Profase	APC/C-Cdc20 (principio mitosis); APC/C-Cdh1(G1)
HoxC10	2 cajas D	Profase	APC/C-Cdc20
Nek2A	Caja D y Caja KEN	Profase	APC/C-Cdc20
Ciclina B1	Caja D	Metafase	APC/C-Cdc20 y APC/C-Cdh1
Securina	Caja KEN y Caja D	Metafase	APC/C-Cdc20 y APC/C-Cdh1
Xkid	Caja GxEN	Metafase	APC/C-Cdc20 y APC/C-Cdh1
Ase1	Caja D	Metafase	APC/C-Cdh1
Kip1	Secuencia de 43 aminoácidos, que carece de secuencias de destrucción	Metafase	APC/C-Cdc20
Cin8	Caja KEN y secuencia próxima del extremo carboxilo terminal carente de otros motivos de destrucción	Metafase	APC/C-Cdh1
Geminina	Caja D	Metafase	Desconocida
Tpx2	Caja KEN y la secuencia inicial de 83 aminoácidos carente de otros motivos de destrucción	Anafase	APC/C-Cdh1
Plk1	Caja D	Antes de la salida de mitosis	APC/C-Cdh1
Aurora A	Caja A y caja D entre los aminoácidos 378-386	Antes de la salida de mitosis	APC/C-Cdh1
Cdc20	Caja KEN y caja CRY	Antes de la salida de mitosis	APC/C-Cdh1
Aurora B	caja D entre los aminoácidos 315-318	Antes de la salida de mitosis	APC/C-Cdh1
Skp2	Caja D	G1	APC/C-Cdh1

Tabla I-II: Relación de los sustratos de APC/C. Se indican la secuencia o secuencias de reconocimiento necesarias para el proceso de degradación. En los casos de Aurora A y B se indica la localización exacta de la caja D concreta involucrada en su proteólisis, ya que ambas proteínas presentan más de un motivo de destrucción de este tipo.

Apc10/Doc1 podría desempeñar esta función, ya que los mutantes que carecen de esta subunidad son incapaces de unir sustratos (Passmore *et al.*, 2003). Así, APC/C dispondría de 2 receptores distintos (Cdc20 o Cdh1 y Apc10/Doc1) para el reconocimiento de señales de destrucción.

Recientemente, se ha identificado una secuencia de degradación diferente en Cdc20, denominada caja CRY (CRYxPS), necesaria junto con la caja KEN para su destrucción dependiente de APC/C-Cdh1 (Reis *et al.*, 2006).

3.4. Regulación de la actividad de APC/C

3.4.1 Fosforilación de los componentes de APC

La fosforilación de los componentes de APC/C es uno de los mecanismos utilizados por la célula para modular su actividad. Así, las subunidades con motivos tetratricopéptidos (Apc3/Cdc27, Apc6/Cdc16, Apc7 y Apc8/Cdc23) y Apc1 son fosforilados por el complejo ciclina B/Cdk1 (Peters *et al.*, 1996), lo que incrementa la unión de Cdc20 y, en consecuencia, activa APC/C (Kraft *et al.*, 2003). Por el contrario la fosforilación *in vitro* de APC/C a cargo de PKA (Protein kinase A, proteína quinasa A) inhibe la ubiquitinación de la ciclina B, incluso en presencia de Cdc20 y Cdh1 (Kotani *et al.*, 1998). La fosforilación de Cdc20 no es necesaria ni para la unión ni para la activación de APC/C (Kramer *et al.*, 2000). Sin embargo, la fosforilación de Cdc20 en los residuos Ser 50, Thr64, Thr68 y Thr 79 durante la mitosis es un requisito para la inhibición de APC/C por el SAC (Chung and Chen 2003).

La regulación mediante fosforilación de Cdh1 es necesaria ya que sus niveles proteicos son relativamente constantes a lo largo del ciclo celular (Prinz *et al.*, 1998) e incluso son detectables en tejidos que no presentan elevada actividad proliferativa

como es el cerebro adulto (Gieffers *et al.*, 1999). Durante el ciclo celular, Cdh1 está en estado desfosforilado al final de la fase M y durante la fase G1, mientras que durante la fase S y en las fases G2 y parte de M está fosforilado (Zachariae *et al.*, 1998). En eucariotas superiores la fosforilación de Cdh1 al comienzo de la mitosis está mediada por el complejo ciclinaB/Cdk1 (Kramer *et al.*, 2000). La desfosforilación de Cdh1 al final de la mitosis se produce a cargo de la fosfatasa Cdc14, que es el efector final del grupo de proteínas conocidas como MEN (mitotic exit network, red de la salida de mitosis). Esta maquinaria está poco conservada en mamíferos, aunque poseen algunos ortólogos. En experimentos *in vitro* la proteína hCdc14a, ortólogo de Cdc14 en humanos, puede desfosforilar Cdh1 y activar APC/C-Cdh1 (Bembenek and Yu 2001).

Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que Cdh1 es fosforilado por Cdk5 en las neuronas postmitóticas (Maestre *et al.*, 2008), lo que provoca la inactivación del complejo APC/C-Cdh1 y la subsecuente acumulación de ciclina B1 y apoptosis neuronal (Almeida *et al.*, 2005).

3.4.2 Inhibición de Cdc20 y Cdh1 por el SAC

El SAC es un mecanismo molecular que retrasa el comienzo de la anafase hasta que cada cinetocoro no se ha unido correctamente al huso mitótico, lo que garantiza la correcta segregación de los cromosomas. Es activado por los cinetocoros que no se han unido a los microtúbulos y las cromátidas hermanas que carecen de la tensión generada por los polos del huso. Los miembros del SAC incluyen Mad1 (mitotic arrest deficient 1), Mad2, MPS (quinasa que regula la localización de Mad1 y Mad2 en los cinetocoros), Bub1, Bub3 y BubR1. La visión general del mecanismo consiste en la unión de algunos miembros de SAC a los cinetocoros (no unidos a los

microtúbulos o carentes de tensión). Esta unión genera una señal de parada de la anafase, de manera que complejos de BubR1 y sus coinhibidores Bub3 y Mad2 se unen a APC/C-Cdc20, inhibiéndolo (Sudakin *et al.*, 2001). A medida que cada cinetocoro se va anclando a los microtubulos y éstos se van tensando, comienzan a producirse señales inhibitorias contrarias a la señal de parada, que tras la correcta unión del último cinetocoro, provocarían la liberación de las proteínas de control de APC/C-Cdc20, activándolo de nuevo (Mao *et al.*, 2003).

Sin embargo, un trabajo reciente sobre las proteínas de transporte nuclear Rae1 y Nup98 ha cambiado varios aspectos del modelo (Jeganathan *et al.*, 2005) (Fig. 3-l). Los ratones mutantes que expresan bajos niveles de ambos factores, Nup 98 y Rae1, presentan separación prematura de las cromátidas hermanas (PMSC, premature sister chromatid separation) y aneuploidía. Así, Jeganathan y col. han descrito que la degradación de securina ocurre en la prometafase en lugar de la anafase, mientras que la destrucción de la ciclina B1 se produce en el momento correcto. En prometafase, la interacción de Rae1 y Nup98 se produce específicamente con APC/C-Cdh1, y no con APC/C-Cdc20, inhibiendo dicho complejo (Jeganathan *et al.*, 2005). La disociación de Rae1 y Nup98 de APC/C-Cdh1 coincide con la liberación de BubR1 de APC/C-Cdc20. Actualmente, se desconoce la señal que desencadena la unión de Rae1 y Nup98 a Cdh1 así como la que promueve su liberación de APC/C-Cdh1. Se ha sugerido que Rae1 forma un complejo con Bub1 localizado en los cinetocoros no unidos al huso (Babu *et al.*, 2003) que podría regular la unión de Nup98-Rae1 a APC/C-Cdh1, de la misma forma en que Bub3-BubR1-Mad2 se unen a APC/C-Cdc20 a través de la regulación de otras proteínas del SAC asociadas a los cinetocoros.

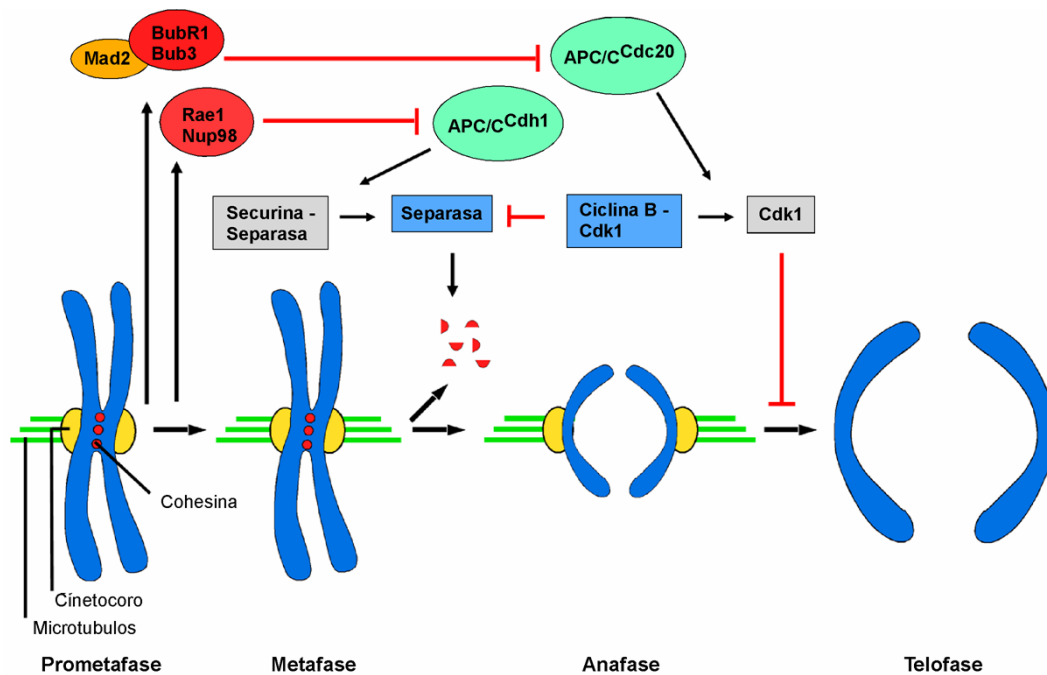


Figura 3-I. Regulación de APC/C en la transición de metafase a anafase por el SAC. Durante la prometáfase, las proteínas del SAC, Mad2, BuR1 y Bub3 son activadas en los cinetocoros (indicados en amarillo) que no están unidos a microtúbulos (indicados en verde), y liberadas junto con los factores nucleocitoplásmicos Rae1 y Nup98. Los complejos Mad2-BubR1-Bub3 y Rae1-Nup98 inhiben la capacidad de APC/C unido a Cdc20 y Cdh1 de ubiquitinar la securina o la ciclina B1, respectivamente. En metafase, cuando todos los cinetocoros están unidos a los microtúbulos, APC/C activado por Cdc20 y por Cdh1 ubiquitina a ambos sustratos, y, en consecuencia, la separasa se activa y se inactiva Cdk1. La separasa destruye los complejos de cohesina (indicados como círculos rojos), que mantenían unidas las cromátidas hermanas, iniciándose su segregación. Por otro lado, la inactivación de Cdk1 lleva a la defosforilación de sus sustratos, lo que permite la salida de mitosis. Modificado de (Peters 2006).

3.4.3 Otros mecanismos de inactivación de APC/C-Cdh1 independientes de la fosforilación

Además de la inactivación de APC/C-Cdh1 durante la mitosis, en la transición de la fase G1 a la fase S también se requiere la disminución de la actividad del complejo. La inhibición de APC/C-Cdh1 se produce no sólo a través de la fosforilación de Cdh1, sino también por inhibición directa de la función de APC/C a través de la

unión de la proteína Emi1 (early mitotic inhibitor 1, inhibidor mitótico temprano 1). Este inhibidor es necesario para la entrada tanto en fase S (Hsu *et al.*, 2002) como en mitosis (Reimann *et al.*, 2001b). Durante el ciclo celular, los niveles de Emi1 oscilan, elevándose en fase S y disminuyendo durante la mitosis. En mitosis la fosforilación de Emi1 por Cdk1 y Plk1 inducen su degradación proteosómica mediada por SCF- β TrCP, lo que se requiere para la destrucción de la ciclina B1 (Margottin-Goguet *et al.*, 2003).

Por tanto, Emi1 generaría el espacio de tiempo necesario entre la activación de la actividad promotora de la mitosis del complejo ciclina B/Cdk1 y la activación de APC/C, que desemboca posteriormente en la destrucción de la ciclina B1.

Aunque inicialmente se pensaba que Emi1 controlaba principalmente la actividad de APC/C-Cdc20, hoy se sabe que es capaz de regular la de APC/C-Cdh1, ya que puede asociarse a ambos complejos (Reimann *et al.*, 2001b; Reimann *et al.*, 2001a).

Durante la transición entre las fases G1 y S, Emi1 se acumula gracias a la activación de E2F que induce su expresión (Hsu *et al.*, 2002). La presencia de Emi1 evita la degradación de la ciclina A al bloquear la actividad de APC/C-Cdh1, lo que, a su vez, permite la activación del complejo ciclinaA/Cdk2. Esta actividad quinásica actúa como un feedback positivo que fosforila Cdh1, disociándolo de APC/C e inactivando la ligasa.

3.5. APC/C-Cdh1 en el control de la fase G0/G1 y la progresión a la fase S

Dependiendo de la disponibilidad de nutrientes, factores de crecimiento y el programa genético intrínseco de cada célula, las células entran en quiescencia (fase G0/G1) o continúan ciclando en un nuevo ciclo celular.

Las células quiescentes presentan una actividad ciclina/Cdk muy baja. Este estado se mantiene gracias a la acción de determinadas proteínas de bolsillo, como son pRb, p107 y p130, Cdh1 y ciertos CKIs. Las proteínas de bolsillo reprimen la actividad de los factores de transcripción E2F, que inducen la transcripción de reguladores positivos del ciclo celular como las ciclinas (A, B y E) y la fosfatasa Cdc25 (Yamasaki and Pagano 2004). El complejo APC/C-Cdh1 activo interviene en la degradación de proteínas implicadas en el paso a fase S como las ciclinas A y B, Cdc25A y Skp2. Esta última, activadora del complejo SCF, a su vez participa en la degradación de los CKIs p21 y p27 (Cardozo and Pagano 2004). Por tanto, la degradación de Skp2 conlleva una acumulación de p27 que bloquea cualquier actividad quinásica residual asociada a las ciclinas E y A.

Los estímulos mitógenos son capaces de inducir la entrada de las células en el ciclo celular. Para ello, es necesario inhibir cada uno de los reguladores de la fase G₀. Esta inhibición es producto de complejas cascadas de señalización que comienzan en la membrana y terminan con la activación de Cdk1 y Cdk2. Ambas quinasas permanecerán activas desde el final de la fase G₁ hasta la anafase. La fosforilación de los inhibidores anteriormente descritos para estas dos quinasas, además de otras en el caso de las proteínas de bolsillo, provoca su inactivación. Así, las proteínas de bolsillo fosforiladas se disocian de los factores E2F, permitiendo su activación. La fosforilación de Cdh1 lleva a su disociación de APC/C, inactivándose su actividad ubiquitina ligasa. Finalmente, la fosforilación de p21 y p27 determina su degradación mediada por el complejo SCF-Skp2. Una importante consecuencia de la activación de E2F es la transcripción de Emi1. Además APC/C contribuye a su propia inactivación ya

que interviene en la degradación de su activador Cdh1y de su E2, UBCH10 (Lukas and Bartek 2004) (Fig. 4-l).

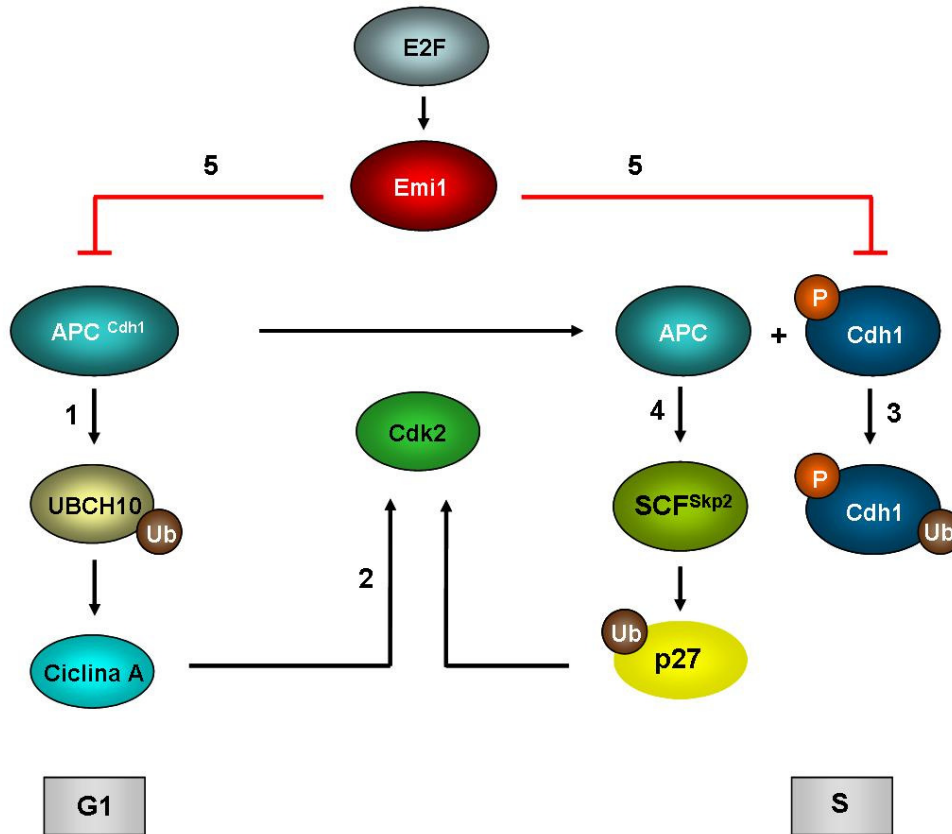


Figura 4-l. Inactivación de APC/C-Cdh1 en la transición de fase G1 a fase S. 1) Durante la fase G1, la enzima conjugante ó E2, UBCH10, se degrada por acción de APC/C-Cdh1, lo que lleva al incremento de sus sustratos como la ciclina A y Skp2. **2)** La ciclina A activa a Cdk2, **3)** que a su vez fosforila Cdh1, lo que determina su disociación de APC/C. **4)** A su vez, Cdh1 fosforilado es ubiquitinado por SCF, activo gracias a la unión de su activador Skp2, que, además, interviene en la degradación de p27, lo que también contribuye a la activación de Cdk2. **5)** Por otro lado, las proteínas de bolsillo fosforiladas se disocian de las proteínas de la familia E2F, lo que activa la transcripción, entre otros, de Emi1, importante inhibidor de APC/C.

4. FUNCIÓN DE APC/C-Cdh1 EN EL MANTENIMIENTO DE LA QUIESCENCIA PREVIA A LA DIFERENCIACIÓN CELULAR.

4.1 Regulación de los niveles de p27.

La proteína p27 fue la primera de las moléculas identificada como CKI, debido a su capacidad de bloquear la actividad de los complejos ciclina E/Cdk2 y ciclina A/Cdk2 en células paradas en fase G1 (Polyak *et al.*, 1994). Su efecto inhibitor se produce a través de la unión tanto a la ciclina A como a Cdk2 (Russo *et al.*, 1996).

Aunque los niveles proteicos de p27 oscilan durante la progresión del ciclo celular, alcanzando su máximo durante la fase G0/G1, los niveles de mRNA permanecen constantes. Por tanto, el principal mecanismo de regulación de los niveles de p27 es a través de la proteólisis dependiente del UPS (Pagano *et al.*, 1995). No obstante, la localización subcelular de la proteína desempeña un importante papel en la regulación de su actividad. Así, el RA es capaz de estimular su acumulación nuclear durante la fase G0/G1, gracias a la fosforilación del residuo Ser10 (Borriello *et al.*, 2006), promoviendo su actividad. Sin embargo, la adicción de sustancias mitógenas al medio de cultivo de células quiescentes redistribuye una fracción de p27 hacia el citoplasma, inactivándolo (Rodier *et al.*, 2001).

La ubiquitinación de p27 se desencadena por la fosforilación del residuo Ser10 (Borriello *et al.*, 2006). Posteriormente, la E3 ubiquitina ligasa SCF-Skp2 reconoce al CKI p27 fosforilado y lo poliubiquitina, para que sea degradado por el proteosoma (Carrano *et al.*, 1999; Sutterluty *et al.*, 1999). Aunque esta vía es la mayoritaria, se ha descrito que una pequeña proporción de p27 se degrada de manera independiente de la actividad de Skp2 aunque dependiente de la actividad del proteosoma. Este proceso

se ha atribuido a una E3 ubiquitina ligasa denominada KPC (KIP1 ubiquitylation-promoting complex, complejo promotor de la ubiquitinación de KIP1) que actúa ubiquitinando a p27 en el citoplasma entre el comienzo y la mitad de la fase G1 (Kamura *et al.*, 2004).

Algunos miembros de la familia de proteínas FoxO (Forkhead box-containing, O subfamily, proteínas que contienen un dominio horquilla, subfamilia O) contribuyen a incrementar los niveles de p27 mediante un mecanismo todavía desconocido (Nakamura *et al.*, 2000). La degradación de uno de sus miembros, FoxO1, es dependiente de la fosforilación en el residuo Ser256 por Akt y posterior ubiquitinación mediada por SCF-Skp2 (Huang *et al.*, 2005). Por tanto, se ha sugerido que Skp2 podría regular también la concentración de p27 indirectamente mediante la ubiquitinación de FoxO1. Además la ruta de las PI3K (Phosphatidil-inositol-3-kinase, fosfatidil-inositol-3-quinasa) induce la expresión de *SKP2* (Mamillapalli *et al.*, 2001) y Akt puede fosforilar directamente p21 y p27 impidiendo el bloqueo de la actividad ciclina-Cdk (Bloom and Pagano 2003).

4.2 Regulación de los niveles de Skp2.

El descubrimiento de la proteína Skp2 precedió a la identificación de las proteínas con motivo F-box como componentes de la ubiquitina ligasa SCF. Se observó que una importante fracción de los complejos ciclinaA-Cdk2 se asociaba con tres proteínas (p9, p19 y p45) (Zhang *et al.*, 1995), actualmente conocidas como Cks1, Skp1 y Skp2, respectivamente. En ese mismo estudio se describió que la expresión de Skp2 era máxima durante las fases S y G2, pero no en la fase G1, a pesar de que los

niveles de mRNA muestran ligeras fluctuaciones a lo largo de todas las fases del ciclo celular (Wirbelauer *et al.*, 2000).

Skp2 como activador del complejo SCF está implicado en la degradación de diversas proteínas reguladoras del ciclo celular. Aunque p27 es su principal sustrato, participa en la degradación de otras moléculas como son otros CKIs relacionados con p27 (p21 y p57), p130, ciclina A, ciclina D1, ciclina E, E2F1, ORC1, CDT1, CDK9, MYC, B-MYB, SMAD4, RAG2, UBP43, FOXO1 y papilomavirusE (revisado en (Nakayama and Nakayama 2005)).

Inicialmente, en células quiescentes se observó que el descenso de los niveles de Skp2 era debido a la autoubiquitinación cuando esta proteína F-box se ensamblaba en complejos con Cul1 (Wirbelauer *et al.*, 2000). Posteriormente, se demostró que la disminución de los niveles proteicos de Skp2 en la transición G0/G1 son debidos a su ubiquitinación mediada por APC/C-Cdh1 (Bashir *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2004).

La degradación de Skp2 mediada por el complejo APC/C-Cdh1 es dependiente de la presencia de una caja D en el extremo amino terminal; así, la delección de ésta genera una proteína no degradable y activa en células en fase G1. Sin embargo, la proteína Skp2 que carece de la caja D, conserva la capacidad de interactuar con Cdh1, ya que el sitio de unión de Skp2 con Cdh1 reside en una secuencia situada entre los aminoácidos 45 y 94 (Bashir *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2004).

4.3 Regulación del eje Cdh1-Skp2-p27 en tumorigénesis y diferenciación.

La función de p27 como supresor tumoral está ampliamente aceptada, no sólo por su actividad como CKI, sino por la información obtenida de los modelos animales, en los que se observa que la mutación de uno de los alelos del gen *Cdkn1b*, que

codifica la proteína p27 en ratón, da lugar a ratones más susceptibles a la tumorigénesis (Fero *et al.*, 1998). Sin embargo, en humanos la pérdida de uno de los alelos del gen que codifica p27 es muy infrecuente, y la mutación del segundo alelo se produce en raros casos (Kawamata *et al.*, 1995).

Existen numerosos estudios en los que se ha descrito una disminución de los niveles de p27 en tumores humanos, como cánceres de colon, mama, próstata, pulmón, ovario, tumores cerebrales y linfomas, entre otros (Esposito *et al.*, 1997; Loda *et al.*, 1997; Kawana *et al.*, 1998; Piva *et al.*, 1999; Chiarle *et al.*, 2000; Kudo *et al.*, 2001), lo que pone de manifiesto la importancia del control de la expresión de la proteína. La desregulación en la expresión de p27 es consecuencia de la desregulación de los mecanismos de control post-transcripcionales y, en muchos casos, a la potenciación de su proteólisis (Bloom and Pagano 2003). Por tanto, las proteínas involucradas en la degradación de p27 tendrán propiedades oncogénicas. Así, la expresión del gen *SKP2* se correlaciona, inversamente con los niveles proteicos de p27, así como con el grado de malignidad en gran variedad de tumores (Gstaiger *et al.*, 2001; Hershko *et al.*, 2001; Kudo *et al.*, 2001; Latres *et al.*, 2001; Chiarle *et al.*, 2002; Masuda *et al.*, 2002; Yokoi *et al.*, 2003).

En modelos animales se ha observado que los ratones *Skp2*^{-/-} son de menor tamaño que los controles, sus células contienen elevados niveles proteicos de p27 y ciclina E libre, y presentan alteraciones como poliploidía, alargamiento de los núcleos y endorreduplicación, que desaparecen en los ratones dobles knockout para *Skp2/p27* (Kossatz *et al.*, 2004).

En humanos, el gen *SKP2* se encuentra con frecuencia amplificado y sobreexpresado en cánceres de pulmón (Yokoi *et al.*, 2004). En el caso de los

neuroblastomas, los niveles de la proteína Skp2 no se correlacionan con la expresión del oncogen *MYCN* (Bell *et al.*, 2007). Sin embargo, se encuentran incrementados en los neuroblastomas con mal pronóstico, tanto en aquellos con amplificación de *MYCN* como en los que no amplifican el oncogén. Así, la elevada expresión de *SKP2* constituye un marcador de mal pronóstico independiente del estado de *MYCN*, así como del estadio de la enfermedad, por lo que se ha sugerido que podría desempeñar una función en la progresión de este tipo de tumores (Westermann *et al.*, 2007).

Otras hipótesis que explicaría el incremento en los niveles de Skp2 es la alteración de su degradación a través de distintos mecanismos, como son el aumento en la expresión del inhibidor de APC/C, Emi1, observada en ciertos tumores (Hsu *et al.*, 2002) o la mutación en la secuencia de destrucción de Skp2, que impediría la interacción física con APC/C-Cdh1. Otras posibles causas podrían ser la disminución en la actividad de APC/C-Cdh1 por pérdida de uno de los alelos, ya que la pérdida completa es incompatible con funciones celulares básicas como sugirió el fenotipo letal del ratón Fzr-/Fzr- (Garcia-Higuera *et al.*, 2008), o por desregulación de las proteínas del SAC (Baker *et al.*, 2006).

Además, existen numerosas evidencias de la participación de los CKIs de la familia Cip/Kip en la regulación de procesos de diferenciación de diversos tipos celulares. Recientemente, se ha observado que p27 regula el proceso de neurogénesis coordinando los procesos de salida del ciclo celular, diferenciación y migración durante el desarrollo de la corteza cerebral (Nguyen *et al.*, 2006).

Por otro lado, se ha descrito que pRb estimula el proceso de degradación de Skp2, mediante un mecanismo que implica la interacción con APC/C-Cdh1. Ello contribuiría al aumento en los niveles de p27, impidiendo así la progresión de la fase

G1 a la fase S por un mecanismo independiente de la represión de la transcripción del E2F (Binne *et al.*, 2007). Anteriormente, ya se había observado que pRb activa los procesos de diferenciación y senescencia como consecuencia de su capacidad de inducir la expresión de p27 por un mecanismo aún desconocido (Alexander and Hinds 2001).

El análisis de expresión de las distintas subunidades de APC/C en el cerebro de ratón adulto puso de manifiesto la presencia de Cdh1 y de algunas subunidades de APC/C en las neuronas de la corteza, el hipocampo y el cerebelo (Gieffers *et al.*, 1999). Tras este descubrimiento inicial, estudios posteriores han identificado diversas funciones de Cdh1 en el sistema nervioso central. Así APC/C-Cdh1 participa en el crecimiento axonal (Konishi *et al.*, 2004), la supervivencia neuronal (Almeida *et al.*, 2005) y la función sináptica (Cline 2003). Recientemente, se ha demostrado que la actividad de APC/C-Cdh1 regula la capacidad glucolítica neuronal, desempeñando así una función esencial en el control del metabolismo energético cerebral (Herrero-Mendez *et al.*, 2009).

4.4 Desregulación de las proteínas del SAC en cáncer

La mutación, pérdida o aumento de la expresión de las proteínas del SAC (como Mad2, Bub1, Bub3, BubR1), así como de los factores de transporte nuclear (Rae1 y Nup98) involucrados en la inhibición del complejo APC/C durante prometafase, también están relacionadas con la inestabilidad genómica.

La pérdida total de *MAD2* es letal en embriones de ratón debido a una incorrecta segregación de los cromosomas y apoptosis (Dobles *et al.*, 2000). Incluso la pérdida de una sola copia del gen *MAD2* afecta el SAC, dando lugar al desarrollo de

aneuploidía y la aparición de PMSCS (premature sister chromatid separation, separación prematura de las cromátidas hermanas) (Michel *et al.*, 2001). Aunque la alteración del SAC no parece ser esencial para la viabilidad celular *per se*, ya que si la inactivación de la expresión de *MAD2* tiene lugar simultáneamente a la de p53, no se desencadena el proceso apoptótico (Burds *et al.*, 2005).

Igualmente, los ratones *Bub3*^{-/-} mueren poco después de su implantación en el útero (Kalitsis *et al.*, 2000). Las células de estos ratones muestran características típicas de una desregulación de la mitosis. La pérdida de uno de los alelos de *Bub3* da lugar a una pérdida parcial de la función del SAC, asociada a una incorrecta segregación cromosómica y el desarrollo de moderada aneuploidía, aunque no parecen ser propensos a la generación de tumores espontáneos (Babu *et al.*, 2003).

La proteína Rae1 (RNA export 1), también conocida como Gle2 o mrnp41, fue inicialmente descrita como un factor de transporte que interviene en el transporte nuclear de mRNA a través de los poros nucleares durante la interfase, formando un complejo con la nucleoporina Nup98 (Pritchard *et al.*, 1999). Su función como regulador mitótico se investigó a raíz de la extensa homología que compartía con la proteína Bub3 (Larsen and Harrison 2004) y de su interacción con Bub1 en los cinetocoros durante la mitosis (Wang *et al.*, 2001). De hecho, los ratones *Bub3*^{-/+} y los *Rae1*^{-/+} muestran fenotipos similares, aunque en los dobles mutantes *Bub3*^{-/+}/*Rae1*^{-/+} se acumula un mayor número de células aneuploides y la PMSCS es más elevada, lo que demuestra que son proteínas relacionadas, con papeles esenciales y cooperativos en el SAC (Babu *et al.*, 2003). Recientemente, se ha demostrado que la proteína Rae1 forma un complejo con Nup98 que actúa regulando la degradación de la securina medida por APC/C-Cdh1 como se comentó anteriormente (Jeganathan *et al.*, 2005; Jeganathan *et*

al., 2006). Así mismo, los ratones *Rae1-+/Nup98-/+* presentan un fenotipo similar a los *Rae1-/+*.

Los ratones *BubR1-/-* también mueren durante el período embrionario. La haploinsuficiencia de BubR1 conlleva igualmente a los fenómenos característicos de una alteración en la regulación mitótica descritos anteriormente (Wang *et al.*, 2004). Por otra parte la disminución en la expresión de BubR1 tiene lugar de manera fisiológica durante el envejecimiento. En los ratones transgénicos en los que solo se expresa un 10% de la proteína además de aneuploidia aparece una amplia variedad de fenotipos asociados al envejecimiento, como son esperanza de vida reducida, atrofia muscular, enanismo, lordosis, cataratas, pérdida de grasa subcutánea, cicatrización deficiente e infertilidad, además de senescencia celular (Baker *et al.*, 2004).

Asimismo los ratones *Bub3-+/Rae1-/+* también desarrollan fenotipos asociados al envejecimiento. Así, las células procedentes de estos ratones entran de forma prematura en senescencia y presentan elevados niveles de p19, p53, p21 y p16. En cambio, este proceso no tiene lugar en ratones con haploinsuficiencia para uno de los dos genes (Baker *et al.*, 2006).

5. LA FAMILIA MYC EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

El proto-oncogen *NMYC* fue identificado hace 2 décadas como una región frecuentemente amplificada en neuroblastomas. Posee homología con el oncogen retroviral *VMYC* y su ortólogo celular *MYC* (Schwab *et al.*, 1983). *NMYC* junto con *MYC* y *LMYC* constituyen la familia de oncogenes *MYC*. Todos los miembros de esta familia de genes están implicados en procesos celulares fundamentales como crecimiento, proliferación, apoptosis y diferenciación a través de la activación y la represión de la transcripción de diversos genes.

Debido a la similitud estructural y a las limitadas comparaciones que se han hecho entre los distintos miembros de la familia de genes *MYC* es difícil separar las funciones fisiológicas que desempeña cada miembro, así como el funcionamiento y la regulación. Por tanto, hablaremos de forma genérica de estos aspectos, salvo casos concretos en los que se hayan observado diferencias entre el comportamiento de *NMYC* con respecto a los demás miembros.

Se trata de factores de transcripción del tipo bHLHZ (basic region-Helix-Loop-Helix-leucine Zipper, con dominios región básica/hélice-lazo-hélice/cremallera de leucina) (Fig. 5-1). Su actividad como activadores de la transcripción requiere de la unión con la proteína Max, formándose heterodímeros Myc-Max que se unen a regiones del DNA denominadas cajas-E localizadas en los promotores de los genes diana (Blackwood and Eisenman 1991). Así, Myc actúa como regulador positivo de la expresión génica a través de distintos mecanismos, bien induciendo cambios en la estructura de la cromatina por acetilación de histonas (Cheng *et al.*, 1999; McMahon *et*

al., 2000) o actuando sobre la RNA polimerasa II (Eberhardy and Farnham 2001; Cowling and Cole 2007).

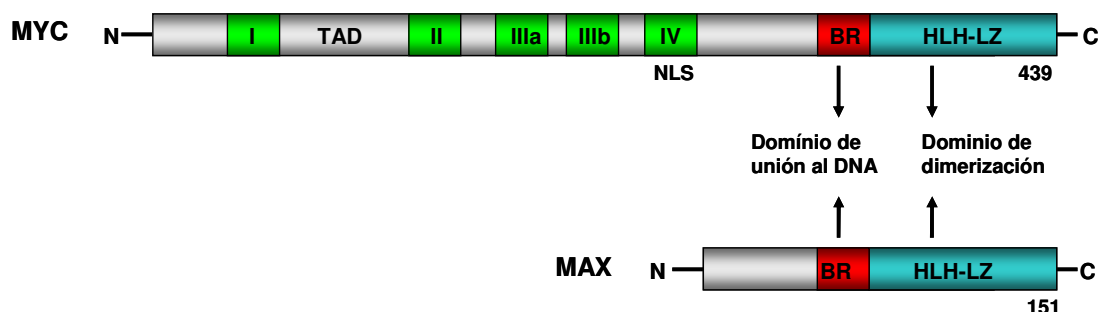


Figura 5-I. Regiones identificadas en las distintas proteínas de la familia Myc. Los miembros de la familia Myc, presentan en su estructura, secuencias de homología altamente conservadas entre c-Myc, N-Myc y L-Myc (denominadas como I, II, IIIa, IIIb y IV), salvo la secuencia IIIa que sólo está conservado en c-Myc y N-Myc. Dentro de la secuencia IV, se localiza la secuencia de localización nuclear (NLS). El TAD (dominio de transactivación) puede inducir la activación génica a través de la interacción con otros dominios de unión al DNA. La región básica (BR) es responsable de la unión a las cajas E, canónicas y no canónicas, del DNA, junto con Max. Y el dominio hélice-lazo-hélice-cremallera de leucina (HLH-LZ) es responsable de la interacción con Max. Modificada de (Meyer and Penn 2008).

La secuencia a la que se une con mayor afinidad el complejo Myc-Max es C/GACCACGTGGTG/C, según los resultados obtenidos *in vitro*. En cambio, *in vivo* los genes diana sólo requieren la presencia del núcleo CACGTG, conocido como caja-E canónica. Sin embargo, existen otras cajas-E no canónicas (CACATG, CATGTG, CACGCG, CATGCG, CACGAG, CACGTTG) también activas (Fernandez *et al.*, 2003; Zeller *et al.*, 2003). Max también puede formar homodímeros y heterodímeros con miembros de las familias Mad y Mnt, a través de la región HLHZ. Así, los heterodímeros Mad-Max y Mnt-Max se unen a la secuencia CACGTG bloqueando la transcripción (Nair and Burley 2006).

Myc también puede reprimir el proceso de transcripción por un mecanismo independiente de la interacción con las cajas-E. El proceso tendría lugar gracias a la interacción del dímero Myc-Max con activadores de la transcripción unidos a elementos iniciadores, presentes igualmente en la región promotora de los genes diana.

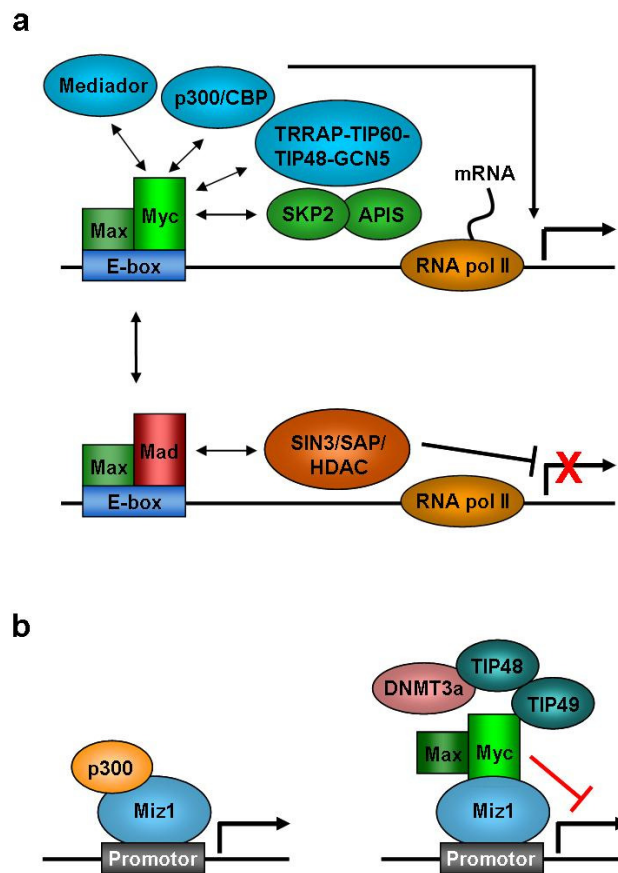


Figura 6-I Regulación transcripcional por las proteínas de la familia Myc. a) Los heterodímeros de Myc-Max activan la transcripción a través de la reclutación de diversos coactivadores (complejos mediadores; histona acetiltransferasas como p300/CBP, GCN5 TIP60; E3 ubiquitina ligasa SCF-Skp2) a secuencias del DNA denominadas cajas E. La transactivación por Myc, es antagonizada por los complejos Mad-Max y Mnt-Max que reprimen la transcripción recluyendo complejos con actividad histona deacetilasa (HDAC). b) La proteína Miz1 activa la transcripción recluyendo a p300, a regiones iniciadoras presentes en los promotores de diversos genes. La unión del heterodímero Myc-Max bloquea esta activación interfiriendo en la unión entre Miz1 y p300y recluyendo la DNA metiltransferasa DNMT3a. CBP: proteína de unión a CREB, RNA pol II: RNA polimerasa II, SAP: proteína amiloide sérica. Modificada de (Adhikary and Eilers 2005).

Entre estas proteínas activadoras se encuentran Miz1 (Myc-interacting zinc finger 1), Sp1 (specificity protein 1), NPY (Nuclear Factor Y), TFII-I (transcription factor II-I) e YY1 (yingyang-1).

Así, Miz1 activaría la transcripción de determinados genes recluyendo acetiltransferasas de histonas, como co-activadores. La posterior unión del complejo Myc-Max bloquearía el proceso de transactivación desplazando la interacción de Miz1 con sus co-activadores y recluyendo además co-represores como metiltransferasas (Adhikary and Eilers 2005) (Fig. 6-I).

5.1 Myc en ciclo celular y diferenciación

Debido a los múltiples procesos en los que está implicado MYC, son muchos los genes que han sido identificados como potenciales dianas. Actualmente, se estima que Myc se une aproximadamente a 25.000 regiones dentro del genoma humano (Fernandez *et al.*, 2003). Sin embargo, los sitios de unión *in vivo* exceden el número de moléculas de Myc presentes, por tanto la unión debe ser breve y transitoria, y, al mismo tiempo, promover cambios duraderos en la organización de la cromatina (Adhikary and Eilers 2005).

En relación con la progresión del ciclo celular, Myc activa la transcripción de los genes que codifican para las proteínas Cdk4, la fosfatasa Cdc25A, ciclina D2 y la familia E2F. Estimula, asimismo, la actividad del complejo ciclina E-Cdk2 a través del bloqueo directo o indirecto de p27 y, por inducción de Id2, actúa como antagonista de pRb. Además, Myc reprime la expresión de genes con efecto antiproliferativo como *gas1*, *gadd45*, *p15* y *p21* (Knoepfler *et al.*, 2002).

Recientemente se ha descrito que c-myc activa directamente la transcripción de los genes, *MAD2* y *BubR1*, que codifican para dos de las proteínas del SAC, a través de cajas-E presentes en los primeros intrones de sus secuencias. Relacionando a Myc con el control de la actividad de APC/C en la prometafase (Menssen *et al.*, 2007).

Existen pocos estudios sobre el papel de N-Myc en la regulación del ciclo celular, aunque resultados *in vivo* e *in vitro* apuntan a que N-Myc puede reemplazar a c-Myc (Malynn *et al.*, 2000).

La presencia de Myc durante el desarrollo es esencial, como se observa en los ratones knockout tanto para *MMYC* como *MYC*, que son inviábiles y mueren hacia la mitad de la gestación (Charron *et al.*, 1992; Davis *et al.*, 1993). Durante el desarrollo, c-Myc se localiza frecuentemente en tejidos con elevado potencial proliferativo, mientras que la expresión de N-Myc está restringida a órganos como el riñón, el cerebro, los linfocitos B y los folículos pilosos, además de en células que se están diferenciando (Malynn *et al.*, 2000). Por tanto, los efectos de N-Myc en el ciclo celular pueden diferir de los de c-Myc, al menos en el contexto de la diferenciación. De hecho, la pérdida de *MMYC* de manera condicional en células progenitoras neuronales de ratón da lugar a la reducción tanto del tamaño del sistema nervioso central como de la población de progenitores neuronales (Knoepfler *et al.*, 2002).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El ácido *trans*-retinoico (RA) desempeña una función fundamental en el desarrollo del sistema nervioso central de mamíferos. Así, el RA inhibe la proliferación de precursores neurales y promueve la neurogénesis en el cerebro adulto, lo que ha servido para considerarlo como una posible herramienta terapéutica para el tratamiento de neuroblastomas; de ahí que el conocimiento de la vía de señalización responsable de estos efectos pueda tener gran importancia. Se sabe que el RA induce la parada del ciclo celular en células de neuroblastoma humano en la fase G1, y que este efecto está asociado a la acumulación de p27. Sin embargo, el mecanismo molecular responsable de este fenómeno se desconoce.

La estabilidad de p27 está regulada por Skp2, el activador de la E3 ubiquitina ligasa SCF, encargada de promover la ubiquitinación y posterior degradación proteosómica de p27 al final de G1. Dado que APC/C-Cdh1 promueve la degradación de Skp2 durante G1, en el presente Trabajo nos planteamos como hipótesis que APC/C-Cdh1 podría regular los efectos antiproliferativos y neurogénicos del RA.

En base a estos Antecedentes e Hipótesis, en el presente trabajo de Tesis Doctoral nos propusimos desarrollar los siguientes Objetivos:

1. Investigar el efecto del RA sobre la expresión de p27 y Skp2 en células de neuroblastoma humano.
2. Estudiar la función de la E3 ubiquitina ligasa APC/C-Cdh1 en los efectos antiproliferativos y neurogénicos del RA.
3. Dilucidar los mecanismos que regulan la actividad de APC/C-Cdh1 durante la diferenciación neuronal.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. CULTIVO DE CÉLULAS Y MANTENIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES

1.1 Especie ensayada, condiciones del animalario y control de la edad gestacional

Empleamos ratas albinas de raza Wistar, criadas y suministradas por el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. Los animales se criaron en jaulas y se mantuvo un ritmo de luz oscuridad de 12 horas, con la fase de oscuridad entre las 20:00 y las 8:00 horas del día siguiente. La humedad osciló entre el 45% y el 65% y la temperatura entre los 20°C y los 25°C. Los animales se alimentaron ad libitum con una dieta sólida estándar (17% de proteínas, 3% de lípidos, 58,7 % de glúcidos, 4,3% de celulosa, 5% de minerales y 12% de humedad) y tuvieron en todo momento acceso libre al agua de bebida.

La edad gestacional de la rata se controló limitándose a una noche el tiempo de cohabitación de las ratas vírgenes con los machos. A las 9:00 horas de la mañana siguiente se separaron aquellas que presentaban espermatozoides en el frotis vaginal, acompañados de células epiteliales de la vagina características del día fértil del estro. Bajo estas condiciones, el período de gestación de la rata se asume que es de 21,7 días.

Todos los tratamientos con animales cumplen con la normativa vigente de la comisión europea del 18.06.2007 (2007/526/CE) y la legislación española (RD/1201/2005) sobre las líneas directrices relativas al alojamiento y cuidado de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos. Los protocolos

fueron aprobados por el Comité ético para la Experimentación Animal y Humana del Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCyL).

1. 2 Cultivo primario de neuronas

Para la realización del cultivo primario de neuronas se emplearon fetos de 16-17 días de gestación (Brewer and Medina 1998). Todo el proceso se realizó en condiciones de esterilidad una cabina de flujo laminar (TC48, Gelaire Flow Laboratories, Virginia, EEUU) y a temperatura ambiente (excepto la tripsinización que se realizó a 37°C). Tras sacrificar las gestantes por dislocación cervical, se procedió a una rápida histerectomía para la obtención de los fetos. Con ayuda de tijeras, pinzas y papel impregnado en etanol al 70%, se retiró el cráneo y se extrajo el cerebro (sin cerebelo, ni bulbo). El tejido se disgregó en la solución de disgregación (NaCl 116 mM, KCl 5,4 mM, NaH₂PO₄ 1,01 mM, MgSO₄ 1,5mM, NaHCO₃ 26 mM, D-glucosa 4 mM, rojo fenol 10 mg/L, albúmina fracción V al 0,3% p/v y DNAsa Tipo I 20 µg/ml pH 7,1), utilizando un bisturí y se dejó sedimentar el tejido durante 4 minutos. Tras retirar el sobrenadante, el tejido disgregado se incubó durante 15 minutos a 37°C en la solución de tripsinización (solución de disgregación suplementada con tripsina al 0,025% p/v), agitándola suavemente a intervalos de 4 minutos.

La tripsinización se detuvo añadiendo suero fetal de ternera (FCS; Roche, Roche Applied Science, San Cugat del Valles, Barcelona, España) a una concentración final del 10% (v/v). A continuación, se centrifugó durante 5 minutos a 500 x g. Seguidamente se aspiró el sobrenadante y el sedimento se resuspendió suavemente en la solución de disgregación con una pipeta Pasteur de vidrio siliconada

unas 9 veces. Tras un período de sedimentación de 4 minutos, el sobrenadante, que contenía las células disociadas, se recogió cuidadosamente en un tubo de 50 ml. Este proceso se repitió 2 veces más. La combinación de los sobrenadantes obtenidos se centrifugó durante 5 minutos a 500 x *g*. El sedimento se resuspendió en 20 ml de NEUROBASAL™ Medium (Gibco, Invitrogen, Prat de Llobregat, Barcelona, España). Una alícuota de esta suspensión celular (10 µl) se mezcló con 30 µl de la solución de disgregación, 40 µl de azul de tripano al 0,4% (v/v) para la determinación del número de células con una cámara cuenta glóbulos de Neubauer (Zeiss, Oberkochen, Alemania). A continuación, se pipeteó el volumen correspondiente de suspensión según el número de células requerido para cada experimento y se diluyó en el medio de cultivo (NEUROBASAL™ Medium, B-27 Supplement 50X (Gibco) al 2% y glutamina 0,5 mM) (Brewer 1995; Brewer and Medina 1998). A continuación, las células se sembraron a una densidad de $2,5 \cdot 10^5$, en placas de poliestireno (Nunc, Roskilde, Dinamarca) con una superficie de 10, 20 ó 60 cm², previamente tratadas con poli-D-lisina 10 µg/ml (Sigma, Barcelona, España). Las placas se mantuvieron en un incubador (Forma 310, Thermo Scientific, Barcelona, España) termostatzado a 37°C, con una atmósfera saturada de vapor de agua, compuesta por 95% de aire y 5% de CO₂. Cada 3 días se realizó el cambio de la mitad del medio de cultivo.

2. Manipulación y condiciones de cultivo de líneas celulares

Las líneas celulares empleadas en este trabajo (Tabla M-I) se mantuvieron en placas para cultivo celular en un incubador (Forma 310, Thermo Scientific). El medio de cultivo empleado fue DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma) suplementado con FCS (inactivado a 55°C durante 1 hora) al 10% (v/v) y los

antibióticos penicilina (100 u/ml), estreptomina (100 µg/ml) y anfotericina B (0,25 µg/ml).

Línea celular	Fuente	Características
SK-N-SH	Células neuroblásticas obtenidas por cultivo directo de la médula ósea de pacientes con neuroblastoma (ATCC, LGC Standards SL, Barcelona)	Una copia del oncogen <i>MYCN</i>
SH-SY5Y	Sublínea obtenida a partir de SK-N-SH (Dra. Carme Gallego)	Una copia del oncogen <i>MYCN</i>
SK-N-BE2	Células neuroblásticas obtenidas por cultivo directo de la médula ósea de pacientes con neuroblastoma (ATCC, LGC Standards SL, Barcelona)	Amplificación del oncogen <i>MYCN</i> (presencia de HSR)
IMR-32	Células neuroblásticas obtenidas por disección de tejido abdominal de pacientes con neuroblastoma (ATCC, LGC Standards SL, Barcelona)	Amplificación del oncogen <i>MYCN</i> (presencia de DMs)

Tabla M-I: Características más destacadas de cada una de las líneas celulares empleadas.

Antes de que las células alcanzaran la confluencia, fueron sembradas en dilución 1:3, para lo cual se realizó un lavado con PBS (NaCl 136 mM, KCl 27 mM, NaH₂PO₄ 7.8 mM, KH₂PO₄ 1.7 mM a pH 7.4, suplementado con los antibióticos mencionados anteriormente), para posteriormente tripsinizarlas, durante 1 minuto, empleando tripsina-EDTA (Sigma) diluida en PBS a una concentración de 5 mg/ml y una temperatura de 37°C. La tripsinización se paró añadiendo FCS al 10% (v/v).

La manipulación de estas células se realizó en condiciones de esterilidad, en campana de flujo laminar y empleando materiales estériles para el contacto directo con el cultivo celular.

II. TRATAMIENTOS CELULARES

1. Diferenciación neuronal de las líneas de neuroblastoma mediante tratamiento con ácido trans-retinoico

El proceso de diferenciación de la línea de neuroblastoma SH-SY5Y se indujo como se describe en (Encinas *et al.*, 2000), y se aplicó el mismo protocolo para el resto de líneas de neuroblastoma. Así, las células se sembraron a una densidad de 12.000 células/cm² en placas de poliestireno previamente recubiertas con colágeno de cola de rata tipo I (BD Biosciences, San Agustín de Guadalix, Madrid, España), a una concentración de 100 µg/ml preparado en ácido acético 0,01 N, en el medio de cultivo (DMEM suplementado con FCS al 10% v/v). Tras 24 horas en cultivo, se añadió ácido *trans*-retinoico (Sigma) a una concentración final de 10 µM, a partir de una disolución 10 mM preparada en DMSO (dimetil sulfóxido). Las células estuvieron en presencia del derivado retinoide durante 5 días, realizándose un cambio de medio a los 3 días del comienzo del tratamiento. Posteriormente el medio se sustituyó por DMEM suplementado con factor neurotrófico derivado de cerebro humano (BDNF, Peprotech, Rocky Hill, New Jersey, E.E.U.U.) a una concentración de 60 ng/ml. Después de 3 días en presencia de BDNF, las células presentaron características morfológicas y moleculares neuronales (Encinas *et al.*, 2000; Almeida *et al.*, 2005). La línea celular SH-SY5Y fue la única que se trató con el BDNF.

2. Transfección transitoria con DNA y RNA

Con el objetivo de aumentar o disminuir la expresión de determinadas proteínas, se utilizó la técnica de lipofección para introducir en las células vectores plasmídicos de sobreexpresión o siRNAs.

2.1. Trasfección con DNA

Las células se resembraron, 16 h antes de la transfección, a una densidad de 100.000 células/cm² en DMEM, sin antibiótico, suplementado con FCS (inactivado) al 10% v/v; así la población celular alcanzaba una confluencia del 80% en el momento de la transfección. Las placas utilizadas para la resiembra se trataron previamente con colágeno de rata tipo I, en el caso de las líneas de neuroblastoma. La transfección se realizó con el reactivo Lipofectamina™ 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los vectores utilizados para la sobreexpresión se detallan en la tabla M-II.

En los casos en los que el vector no codifica la GFP, las células se cotransfectaron con el vector pEGFPC1 en proporción 1:5 respecto al DNA total. Esto nos permitió la cuantificación de las células transfectadas mediante citometría de flujo, así como la observación de los posibles cambios morfológicos a través de microscopía de fluorescencia.

Vector	Procedencia	Secuencia del inserto	Expresión de GFP
Vector de sobreexpresión en células de mamífero bajo control el promotor de citomegalovirus			
pIRES2-eGFP SKP2	Este trabajo	cDNA completo de Skp2 wt (EcoRI/EcoRI) (Dr. M Pagano)	Codifica GFP

pIRES2-eGFP Skp2 Δ db	Este trabajo	cDNA Skp2 sin D-box (EcoRI/EcoRI)	Codifica GFP
pCS2-hEmi1	Dr. P Jackson	cDNA completo de hEmi1wt	No codifica GFP
pcDNA3.1(+) Rae1	Este trabajo	cDNA completo de Rae1 wt (BamHI- XhoI) (IMAGE:40032942, Gene Service)	No codifica GFP
pUHD10(XhoI-) NMYC	Dr. M. Schwab	(Stanton <i>et al.</i> , 1986)	No codifica GFP
pEGFPc1	BD Bioscience Clontech	cDNA completo EGFP	Codifica EGFP (variante de GFP con mayor emisión de fluorescencia y mayor expresión)
Vector de silenciamiento en células de mamífero mediante inducción de síntesis de shRNA bajo control del promotor H1			
pSuper.neo/gfp- Cdh1	(Almeida <i>et al.</i> , 2005)	5'-TGAGAAGTCTCCCAGTCAG-3'	Codifica GFP
pSuper.neo/gfp-Luc	(Ohtsuka <i>et al.</i> , 2004)	5'-CTGACGCGGAATACTTCGA-3'	Codifica GFP

Tabla M-II. Relación de los vectores empleados en las transfecciones transitorias con DNA. Entre paréntesis se indican las secuencias de las enzimas de restricción presentes en los extremos de cada inserto.

2.2. Transfección transitoria con siRNA

El silenciamiento de la expresión génica a nivel post-transcripcional se realizó mediante la transfección con siRNAs, utilizando lipofectamina™ 2000. Las células se sembraron, 16 h antes de la transfección, a una densidad de 50.000 células/cm² en las mismas condiciones descritas anteriormente para la transfección transitoria de DNA. La población celular presentaba una confluencia del 50% en el momento previo a la transfección. La secuencia de los siRNAs empleados (cadena sentido 5'→3') se detallan a continuación:

- siRNA RAE1: 5'-GCAGUAACCAAGCGAUACA-3 (Blower *et al.*, 2005)
(Dharmacon, Lafayette, Indiana, EEUU)
- siRNA NMYC: 5'-UGAUCUGCAAGAACCCAGA-3' (Bell *et al.*, 2006)
(Dharmacon, Lafayette, Indiana, EEUU)
- siRNA LUCIFERASA: 5'-CUGACGCGGAAUACUUCGA-3'
(Dharmacon, Lafayette, Indiana, EEUU)

III. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS DE DNA RECOMBINANTE

Los vectores plasmídicos elaborados en este trabajo, descritos en la tabla M-II, se construyeron bien por amplificación del inserto mediante PCR (vectores pIRES2-eGFP SKP2 y pIRES2-eGFP SKP2 Δ db) o bien mediante digestión y posterior ligación del inserto en un nuevo vector de expresión (vector pcDNA3.1(+)-RAE1). En ambos casos, la amplificación de las construcciones plasmídicas se llevó a cabo mediante transformación previa de células competentes de *E. coli* (DH5 α). Seguidamente, se aisló el DNA plasmídico, y se obtuvo la secuencia codificante de interés, que se ligó en el vector correspondiente. En todos los casos, el vector fue digerido con las enzimas de restricción necesarias. Este análisis de restricción permitió descartar las construcciones vacías, así como las que no estaban clonadas correctamente.

1. Transformación de células competentes de *E. coli* (DH5 α)

Un volumen de 20 μ l de plásmido fue añadido a 100 μ l de células competentes. La mezcla se incubó durante 30 segundos a 4°C, 45 segundos a 42 °C y 2 minutos a 4°C. Seguidamente, se añadieron 400 μ l de SOC (bactotriptona al 2% p/v,

extracto de levadura al 0.5% p/v, NaCl 8,5 mM, KCl 2,5 mM, glucosa 20 μ M y MgCl₂ 10 mM, pH 7,0) y se incubó durante 1 h a 37°C con agitación (Forma Orbital Shaker Modelo 420, Thermo Fisher Scientific). Finalmente, las bacterias transformadas se sembraron en placas de LB-agar (bactotripton a al 0.1% p/v, extracto de levadura al 0.05% p/v, NaCl 170 mM y agar al 1.5 % p/v) en presencia del antibiótico para el que codifican resistencia y se mantuvieron en un incubador a 37°C, toda la noche. El DNA de cada colonia transformada fue aislado y analizado mediante digestión con enzimas de restricción.

2. Aislamiento del DNA plasmídico

La obtención a pequeña escala del DNA plasmídico de cada colonia transformada se llevó a cabo mediante el método de la lisis alcalina (Birnboim and Doly 1979), conocido comúnmente como “Miniprep”.

La purificación de DNA plasmídico a mayor escala se realizó con el kit Wizard® plus purification system (Promega, Promega Biotech Ibérica, Alcobendas, Madrid, España), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para ello partimos de una colonia que contenía la construcción plasmídica correcta que fue incubada en 200 ml de medio líquido 2xYT (bactotripton a al 1.6% p/v, extracto de levadura al 1% p/v, NaCl 85 mM) con antibiótico en agitación a 37°C durante toda la noche.

3. Determinación de la concentración de ácidos nucleicos

La concentración de DNA se determinó en un Biophotometer (Eppendorf, Madrid, España), determinando la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm.

4. Digestión del DNA

Todos los vectores plasmídicos utilizados en este trabajo fueron digeridos con diferentes enzimas de restricción (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante, para corroborar la correcta clonación del inserto correspondiente. Asimismo, los vectores vacíos pIRES2-eGFP y pcDNA 3.1(+), así como las secuencias codificantes de las proteínas Skp-2, Skp-2 Δ db y Rae-1, se digirieron con las enzimas indicadas en la tabla M-II. Los vectores vacíos ya linearizados fueron tratados posteriormente con fosfatasa alcalina 1 U (Roche) durante 15 minutos a 37°C.

5. Electroforesis de fragmentos de DNA

Los fragmentos de DNA se separaron en función de su tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa (Sigma) preparados a una concentración adecuada (entre el 0.8% y el 2% en relación p/v, según el tamaño de los fragmentos a separar) en tampón TAE 1X (Tris 0,2M, ácido acético glacial 0,1M y Na₂EDTA·2H₂O 5 mM) y con bromuro de etidio 0.8 μ g/ml. Las muestras de DNA se prepararon en tampón de carga (azul de bromofenol al 0.03% p/v, cianol de xileno al 0.03% p/v, glicerol al 60% v/v y EDTA 60 mM) y agua ultrapura estéril, hasta igualarlas todas al mismo volumen. La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante (40-100 V) en tampón TAE 1X. Como indicadores del tamaño molecular se utilizaron marcadores de 1 Kb, 100 pb y 50 pb (Biotools, Madrid, España). Finalmente, las imágenes se captaron con una cámara digital acoplada al analizador de imagen Gel Doc 2000 (Biorad, Life Science, Alcobendas, Madrid, España).

6. Purificación y ligación de fragmentos de DNA

La purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa se llevó a cabo cortando la banda correspondiente, que se procesó con el sistema GenElute™ Gel Extraction Kit (Sigma), según las instrucciones del fabricante.

Las construcciones de DNA recombinante se obtuvieron mediante ligación de los fragmentos purificados del inserto y el vector plasmídico. La ligación se realizó con la ligasa de DNA del fago T4 (Fermentas, Quiagen, Madrid, España), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cantidad de fragmento (ng) utilizado fue directamente proporcional al tamaño en Kb del fragmento e inversamente proporcional al del vector. La ligación se realizó a temperatura ambiente durante 1 h o a 16°C durante toda la noche. Tras este periodo, se transformaron las bacterias competentes con 1 µl y 2 µl de la mezcla de ligación.

7. Obtención de los insertos SKP2 y SKP2Δdb

Los insertos SKP2 y SKP2Δdb se obtuvieron por PCR. Para ello, se prepararon 50 µl de mezcla de reacción con los siguientes componentes: MgCl₂ 200 µM, tampón standard 1X (Biotools), dNTPs (Roche) 200 µM, oligonucleótidos 5' y 3' 1 µM y DNA polimerasa recombinante de *Thermus sp.* 1 U. La secuencia de los oligonucleótidos empleados se detalla en la tabla M-III.

Las condiciones de la PCR para todos los cebadores fueron: 1 x (95°C, 10 min), 40 x (95°C, 30 seg; 60,2°C, 30 seg; 72°C, 90 seg), 1x (72°C, 10 min) y 1x (4°C).

Nombre	Secuencia	Tamaño (pb)
SKP2	Oligonucleótido 5': 5'-GGAATTCATGCACAGGAAGCACCTCCAGGAGATTCCAGA-3' Oligonucleótido 3': 5'-GGAATTCCTCATAGACAACCTGGGCTTTTGCAGTGTTCAGTC-3'	1291
SKP2 Δ db	Oligonucleótido 5': 5'-GGAATTCATGCACCTGAGTAGCAACGTTGCCACCAGCTT-3' Oligonucleótido 3': 5'-GGAATTCCTCATAGACAACCTGGGCTTTTGCAGTGTTCAGTC-3'	1264

Tabla M-III: Relación de la secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la PCR para la obtención de los insertos SKP2 (cDNA completo del gen *SKP2*) y SKP2 Δ db (cDNA mutado del gen *SKP2*, que carece de la secuencia de la caja de destrucción, D-box).

IV. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

1. Western blot

1.1. Obtención de extractos proteicos totales.

La obtención de los extractos proteicos totales a partir de células en cultivo se realizó mediante lavado de la monocapa de células con PBS frío y posterior adición del tampón RIPA (Na₂HPO₄ 12,5 mM, Tritón X-100 al 1% v/v, SDS al 0,1% v/v, EDTA 10 mM, NaCl 150 mM pH 7, suplementado con los inhibidores de proteasas y fosfatasa: aprotinina 10 µg/ml, leupeptina 10 µg/ml, inhibidor de tripsina 10 µg/ml, TLCK 100 µM, TPCK 100 µM, PMSF 100 µM, fenantrolina 1 mM, pestatina 10 µg/ml, NaF 50 mM, ortovanadato sódico 1mM). A continuación, el lisado celular se mantuvo en hielo durante 5 minutos, se incubó a 100°C durante 5 minutos, y se sometió a

ultrasonidos (sonicador modelo 8891, Cole Parmer) durante 5 minutos. Finalmente, se centrifugó a $13000 \times g$ durante 9 minutos y el sobrenadante se guardó a -80°C , para posteriores análisis.

1.2. Obtención de los extractos nucleares y citosólicos

Se realizó según se describe en (Pagano *et al.*, 1993) con algunas modificaciones introducidas en nuestro laboratorio. Las células se lavaron con PBS frío que contenía MgCl_2 1 mM. Seguidamente, se recogieron en un tampón hipotónico (HEPES 10 mM, MgCl_2 1,5 mM, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, NP40 al 0,1% v/v y sacarosa 300 mM) suplementado con los inhibidores de proteasas descritos anteriormente. Tras una incubación en hielo durante 15 minutos, las muestras fueron centrifugadas a $500 \times g$ a 4°C , durante 5 minutos. El sobrenadante, que contiene el extracto citosólico, se incubó a 100°C durante 5 minutos y se almacenó a -80°C , para su posterior procesamiento. La lisis de los núcleos celulares se produjo mediante resuspensión e incubación del sedimento en un tampón hipertónico (HEPES 50 mM, MgCl_2 1,5 mM, KCl 10 mM, EDTA 0,5 mM y NP-40 1% v/v) suplementado con los inhibidores de proteasas y fosfatasa, durante 2 horas en hielo. Finalmente, el extracto nuclear se hirvió y sonicó durante 5 minutos y se congeló a -80°C hasta su utilización.

1.3. Cuantificación de proteínas

Se realizó mediante el sistema colorimétrico BCA (Pierce, Cultek S.L., Madrid, España), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El sistema consiste en la formación de un compuesto coloreado que presenta una absorbancia lineal a una

longitud de onda de 562 nm que es proporcional a la concentración de proteínas presentes en la muestra. Inicialmente se realizó una recta patrón, utilizando albúmina bovina (BSA) como control.

1.4. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE

La separación de proteínas de cada muestra se llevó a cabo mediante electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).

Las proteínas (20-50 µg) se resuspendieron en tampón de carga (2-mercaptoetanol al 4% v/v, SDS al 8% p/v, azul de bromofenol al 0,02 % p/v, glicerol al 4% v/v y Tris-base 250 mM) en un volumen correspondiente a la cuarta parte del volumen final, se hirvieron durante 5 minutos y se centrifugaron a 13000 x *g* durante 9 minutos. Se utilizaron geles de poliacrilamida con un porcentaje comprendido entre el 8% y el 12% y un marcador de peso molecular (BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder, Invitrogen). La electroforesis se realizó en un sistema de electroforesis vertical (MiniProtean-3®, Bio-Rad Laboratories, California, EEUU) a voltaje constante entre 150-200 V, durante 45-60 minutos, en presencia de tampón de electroforesis (Tris 25 mM, SDS al 0,1% v/v y glicina 205 mM).

1.5. Electrotransferencia

Tras la electroforesis, se procedió a la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa (Hybond®, Amersham Bioscience, GE Healthcare, Barcelona, España) mediante electrotransferencia en un sistema Mini Trans-Blot®

(BioRad Laboratories, California, EEUU). El tampón de transferencia contenía Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20% (v/v), pH 8,3. El proceso se llevó a cabo a un amperaje constante de 250 mA a 4°C, durante 2 horas.

1.6. Inmunodetección

Tras la electrotransferencia, las membranas se bloquearon con una solución de leche al 5% (p/v; *Sveltesse* Nestlé) preparada en TTBS (Tris 2 mM, NaCl 50 mM, Tween-20 al 0,1% v/v, pH 7,5) a temperatura ambiente durante 1 hora, disminuyendo así la unión inespecífica de los anticuerpos empleados en los siguientes pasos del ensayo.

Tras lavar la membrana dos veces durante 5 minutos con TTBS, se procedió a su incubación con el anticuerpo primario (ver Tabla M-IV) en una solución de BSA (Sigma) al 2% (p/v) preparada en TTBS a 4°C durante toda la noche. Esporádicamente, la incubación se realizó a 37°C durante 3 horas. La inmunodetección se completó con la adición de los compuestos quimioluminiscentes bien Supersignal (Supersignal™ West Dura, Pierce) o bien luminol (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Alemania), según los niveles de la proteína estudiada. Las membranas se expusieron a una película Kodak biomax XAR (Sigma) y, una vez reveladas, se digitalizaron para cuantificar la intensidad de las bandas, utilizando un software para el tratamiento de imágenes (NIH Image, Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda, MD, EEUU). Los resultados se normalizaron respecto a la señal obtenida para la proteína GAPDH, utilizada como control de carga.

Anticuerpo Primario	Tipo	Especie	Dilución	Procedencia
Anti-Ciclina B1	Monoclonal (GNS-1)	Ratón	1/500	BD Pharmingen
Anti-Cdh-1	Monoclonal (AR-38)	Ratón	1/10	Dr. J Gannon
Anti-GAPDH	Monoclonal (6C5)	Ratón	1/10000	Ambion
Anti-Gap43	Monoclonal (GAP-7B10)	Ratón	1/2000	Sigma
Anti-Map2	Monoclonal (AP-20)	Ratón	1/1000	Sigma
Anti-Nup98	Policlonal	Conejo	1/1000	Cell Signaling
Anti-N-Myc	Monoclonal (NMYC-1)	Ratón	1/1000	Abcam
Anti-p27	Monoclonal (G173-524)	Ratón	1/1000	BD Pharmingen
Anti-p21	Monoclonal (SXM30)	Ratón	1/500	BD Pharmingen
Anti-PCNA	Monoclonal (24)	Ratón	1/1000	BD Pharmingen
Anti-pRB	Monoclonal (G3-245)	Ratón	1/1000	BD Pharmingen
Anti-Rae1	Policlonal	Cabra	1/2000	Abcam
Anti-Skp2	Monoclonal (SKP2-2B12)	Ratón	1/250	Zymed
Anti-Skp1	Monoclonal (52/p19)	Ratón	1/1000	BD Pharmingen
Anti- Tau	Policlonal	Conejo	1/2000	Abcam
Anti-Topoisomerasa II α	Monoclonal (31/Topo IIa)	Ratón	1/200	BD Pharmingen
Anticuerpo Secundario	Enzima conjugada	Especie	Dilución	Procedencia
Anti-Ratón	Peroxidasa de rábano	Cabra	1/1000	Amersham
Anti-Conejo	Peroxidasa de rábano	Cabra	1/10000	Amersham
Anti-Cabra	Peroxidasa de rábano	Conejo	1/100000	Abcam

Tabla M-IV: Relación de los anticuerpos primarios y secundarios empleados, especificando las concentraciones experimentales utilizadas.

Tras ese período se realizaron 4 lavados, dos de 5 minutos y otros dos de 10 minutos con TTBS. A continuación, se incubó la membrana en TTBS que contenía leche al 2% (p/v) y el anticuerpo secundario correspondiente a temperatura ambiente, durante 1 hora Finalmente, la membrana se lavó 4 veces, como se ha descrito anteriormente, realizándose en último lugar un lavado de 5 minutos con TBS (Tris 2 mM, NaCl 50 mM, pH 7,5).

2. Inmunocitoquímica

Las células sembradas en placas de 10 cm² se fijaron con paraformaldehído al 4% (v/v) en PBS, durante 30 minutos, y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.1% (v/v) en PBS, durante 5 minutos. Posteriormente, las células se incubaron en la solución de bloqueo (PBS con Triton X-100 al 0,1% v/v y suero de caballo al 5% v/v) a temperatura ambiente, durante 30 min.

Las células se incubaron en la solución de bloqueo que contenía los anticuerpos, anti-Map2 (1:200; Sigma), anti-Cdh-1 (1:5) o anti-Skp2 (1:50, Zymed), a 4°C durante toda la noche. Tras cuatro lavados con PBS, las células se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con AlexaFluor488 ó AlexaFluor594 (Molecular Probes®, Invitrogen) a temperatura ambiente, durante 1 hora. Finalmente, las placas se lavaron tres veces con PBS y se incubaron en PBS que contenía DAPI (10 µM; Sigma) a temperatura ambiente, durante 15 minutos.

Tras lavar dos veces con PBS y una vez con agua estéril, se tomaron microfotografías con un microscopio invertido de fluorescencia (Leica IM-50) acoplado a una cámara digital (Leica DC-100).

V. ESTUDIO DE LA TRANSCRIPCIÓN: CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE mRNA

1. Extracción de mRNA total

Para la extracción y purificación de mRNA total de los cultivos celulares se utilizó el kit Genelute™ Mammalian Total RNA Kit (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2. Cuantificación de mRNA total

La cuantificación del mRNA se llevó a cabo espectrofotométricamente a una longitud de onda de 260 nm, utilizando el Biophotometer (Eppendorf). Asimismo, la calidad del mRNA se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa del 0,8% (p/v) preparado en tampón TAE 1X (que contenía dietilpirocarbonato, DEPC) con bromuro de etidio 0.8 µg/ml. El tampón TAE 1X fue también empleado como tampón de la electroforesis. Las muestras se suspendieron en tampón de carga (glicerol al 50% v/v, EDTA 1 mM, azul bromofenol al 0,4% p/v y cianol de xileno al 0,4% p/v). Las muestras en las que se observaban 2 bandas nítidas (correspondientes a los rRNAs 28S y 18S), fueron utilizadas para posteriores análisis.

3. Northern Blot

3.1 Electroforesis de RNA total en condiciones desnaturizantes en gel de agarosa-formaldehido

Se partió de 10 µg de RNA total. Tras evaporación a vacío del disolvente, se añadió a cada una de las muestras una mezcla de carga compuesta por: tampón de carga (detallado anteriormente) al 10%, MOPS 10X al 10%, formamida al 50%, formaldehído al 15%, en relación v/v. La solución de MOPS 10X se preparó con MOPS 0,2 M, acetato de sodio 0,02 M y EDTA 0,01 M, pH 7. Las muestras se calentaron a 65°C durante 10 minutos y se cargaron en un gel de agarosa al 1% (p/v), MOPS 10X al 10% (v/v), formaldehído al 6% (v/v). La electroforesis se llevó a cabo en tampón de electroforesis MOPS 1X a 30V, durante 6 horas.

3.2 Transferencia del RNA del gel de agarosa/formaldehido

El RNA se transfirió a una membrana de nylon (GeneScreen Plus, NEN Life Science, Boston, M.A., EEUU), durante toda la noche, utilizando como tampón de transferencia SSC 10X (Citrato trisódico 150 mM y NaCl 1,5 M, pH 7). A continuación, el RNA se fijó a la membrana mediante radiación ultravioleta (UV Stratalinker, Mod. 2400, Genetic Res. Instruments, Essex, Reino Unido).

3.3 Marcaje de la sonda e hibridación

Se utilizaron 20 ng del cDNA de la sonda correspondiente. Ésta se desnaturizó a 100°C, durante 5 minutos, y, posteriormente, se incubó en hielo durante 1 minuto. El marcaje radiactivo de la sonda se llevó a cabo por "random

priming" (Feinberg and Vogelstein 1983), para lo cual se incubó con una mezcla de hexadesoxirribonucleótidos (Boehring Mannheim, Roche), desoxinucleótidos (dATP, dGTP y dTTP, Boehring Mannheim) 0,025 mM, [α - P^{32}]dCTP 20 μ Ci, y la enzima Klenow 2 U, a 37°C durante 2 horas. Para la purificación de la sonda se utilizó una columna de Sephadex®G-50 (Sigma).

Antes de la hibridación con la sonda, las membranas se hidrataron con agua con DEPC y, después, con SSC2X, durante 10 minutos. A continuación, se incubaron a 65°C en la solución de prehibridación (SDS al 1% p/v, NaCl 1M, dextran sulfato al 20% p/v), que contenía la sonda radiactiva (previamente hervida durante 5 minutos). La hibridación se realizó a 65°C durante 18 horas. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con una solución de SSC 2X suplementado con SDS al 1% v/v a 65°C, durante 10 minutos, el primero, y 30 minutos, el resto, y, posteriormente, se realizó un último lavado a temperatura ambiente con una solución de SSC 0,1X, durante 30 minutos.

Finalmente, la membrana se envolvió en plástico y se expuso a una película autorradiográfica (Kodak biomax XAR film), durante una semana. Para cuantificar la intensidad de las bandas las películas se digitalizaron, utilizando el programa NIH Image (Wayne Rasband). Los resultados se normalizaron respecto a la señal obtenida para la ciclofilina, utilizada como control de carga. Como sondas se utilizaron:

- Ciclofilina (número de acceso: M19533): un fragmento de 767 pb correspondiente al cDNA completo de rata.
- SKP-2 (número de acceso : AB070979): un fragmento de 1275 pb correspondiente al cDNA humano completo.

- Rae-1 (número de acceso: BC106924): un fragmento de 1429 pb correspondiente al cDNA humano completo.
- Cdh-1 (número de acceso NM_016263): un fragmento de 3615 pb correspondiente al cDNA humano completo.

4 RT-PCR semicuantitativa

4.1 Retrotranscripción (RT)

El RNA (1 µg) se diluyó, hasta un volumen final de 10 µl, con agua con DEPC en un tubo de microcentrífuga (PCR 8-strip tubes, eppendorf) y se incubó a 70°C, durante 10 minutos. Seguidamente, se añadieron el resto de los componentes de la mezcla de reacción: MgCl₂ 5 mM, tampón de transcripción reversa 1X (Promega), dNTPs (Roche) 500 µM, inhibidor de ribonucleasas (Promega) 2 U, retrotranscriptasa del virus de la mieloblastosis aviar (Promega) 0.5 U y oligo (dT)₁₅ (Promega) 0.5 µg.

La síntesis del cDNA se realizó mediante incubación a 42°C, durante 60 minutos en un termociclador (Mastercycler *epgradient* S, eppendorf). Finalmente, la retrotranscriptasa se inactivó por incubación a 95°C, durante 5 minutos.

4.2. Amplificación del cDNA obtenido por retrotranscripción

En cada PCR se utilizaron dos pares de oligonucleótidos, uno para amplificar el problema y otro para la GAPDH, que se usó de patrón interno. El cDNA (5 µl) producto de la retrotranscripción se añadió a la mezcla (volumen final de 50 µl) compuesta por: MgCl₂ 200 µM, tampón standard 1X, dNTPs 200 µM, oligonucleótidos 5' y 3' 0,5 µM, y la DNA polimerasa recombinante de *Thermus sp.* 1 U. Los oligonucleótidos utilizados

se detallan en la tabla M-V. Las condiciones experimentales de todas las mezclas fueron iguales, ajustándose en cada caso la temperatura de anillamiento específica para cada pareja de cebadores. 1 x (95°C, 10 min), 35/40 x (95°C, 30 seg; 55,5/55,8/54°C, 30 seg; 72°C, 45 seg), 1 x (72°C, 10 min), 1 x (4°C).

Los cebadores (Tabla M-V) se diseñaron de manera que amplificaran una región comprendida entre dos exones distintos, lo que elimina la posibilidad de considerar señal de contaminación genómica como señal de expresión génica. Los productos obtenidos por retrotranscripción se analizaron al menos en dos PCRs con distinto número de ciclos de amplificación, para asegurar que ésta se encontraba en la fase exponencial.

Nombre	Secuencia	Tamaño (pb)	Temp (°C)
GAPDH	Oligonucleótido 5': 5'-CTGGCGTCTTACCACCAT-3' (Yuan <i>et al.</i> , 2008) Oligonucleótido 3': 5'-AGGGGCCATCCACAGTCTT-3' (Yuan <i>et al.</i> , 2008)	279	57.9
CMYC	Oligonucleótido 5': TCCTCAAGAGGTGCCACG-3' (Perini <i>et al.</i> , 2005) Oligonucleótido 3': TCGGTTGTTGCTGATCTGTC-3' (Perini <i>et al.</i> , 2005)	134	55.5
NMYC	Oligonucleótido 5': ACCCTGAGCGATTCCAGATGAT-3' (Johnsen <i>et al.</i> , 2008) Oligonucleótido 3': GTGGTGACAGCCTTGGTGTT-3' (Johnsen <i>et al.</i> , 2008)	113	54
RAE 1	Oligonucleótido 5': TGGACAGACCATTCCAAAAGCC-3' Oligonucleótido 3': CATGCTGTGCGATCTGTATCGCT-3'	158	55.8

Tabla M-V: Secuencias de los oligonucleótidos empleados en RT-PCR semicuantitativa.

VI ANALISIS DEL CICLO CELULAR: MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

1. Análisis de la incorporación de bromodesoxiuridina

Para la determinación de la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU), se utilizó el sistema comercial APC BrdU Flow Kit (BD Bioscience). Tras la transfección e incubación con ácido retinoico (10 μM) durante 2 ó 3 días, las células se incubaron en medio de cultivo que contenía BrdU 10 μM , durante 6 horas. La BrdU incorporada al DNA celular se determinó mediante el marcaje con el anticuerpo monoclonal anti-BrdU unido al fluorocromo APC. Posteriormente, se analizaron las señales de fluorescencia en el citómetro de flujo FACScalibur.

2. Tinción con yoduro de propidio

Las células se tripsinizaron, se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 1 % en PBS (v/v) a temperatura ambiente, durante 15 minutos. Posteriormente, se incubaron con etanol al 70% (v/v) a 4°C, durante toda la noche. Tras 3 lavados con PBS, se tiñó con yoduro de propidio 30 $\mu\text{g/ml}$ y RNasa 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a 37°C, durante 2 horas. Finalmente, las muestras se analizaron en el citómetro de flujo FACScalibur.

VII ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN

1. Co-inmunoprecipitación de cromatina (Chip)

1.1 "Cross-linking" del DNA con las proteínas asociadas

Las células ($6 \cdot 10^6$) de neuroblastoma SK-N-BE2 se fijaron con formaldehído al 1% en PBS (v/v) en presencia de inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, pepstatina 1 μ M, aprotinina 1 μ g/ μ l, y leupeptina 1 μ g/ μ l) con agitación a temperatura ambiente, durante 10 minutos. El proceso se paró mediante la adición de glicina 0,125 M. Las células se centrifugaron a $500 \times g$ (4°C, 5 minutos) y el precipitado se lavó con PBS (con inhibidores de proteasas) y se incubó en el tampón de lisis I (Pipes 5 mM, KCl 85 mM, NP-40 al 0.5% v/v e inhibidores de proteasas, pH 8) a 4°C, durante 10 minutos. Seguidamente, los núcleos se aislaron mediante centrifugación a $3000 \times g$ (4°C, 5 minutos) y se incubaron en tampón de lisis II (SDS al 1 % p/v, EDTA 10 mM, Tris 50 mM e inhibidores de proteasas, pH 8,0) a 4°C, durante 10 minutos.

1.2 Obtención de una solución de cromatina soluble

El lisado de núcleos se sonicó (30 ciclos, 30 segundos ON/ 30 segundos OFF, por ciclo) en un sonicador Diogenode Bioruptor, a 4°C y se centrifugó a $17900 \times g$ (4°C, 10 minutos), consiguiéndose así una solución de cromatina soluble.

Antes de proseguir con la técnica, se revirtió el "cross-linking" en 100 μ l de muestra y se corroboró que el tamaño del DNA (2 μ g de muestra) era inferior a 500 pb, mediante electroforesis en gel de agarosa del 1% p/v.

1.3 Inmunoprecipitación de cromatina

La cromatina sonicada (25 µg) se diluyó (1:10) en tampón de inmunoprecipitación (Triton X-100 al 1% v/v, EDTA 2 mM, NaCl 150 mM, Tris 20 mM, pH 8.1) y se aclaró mediante incubación con bolas de proteína A/G agarosa (Santa Cruz Biothechnology) en agitación a 4°C, durante 2 horas. Posteriormente, la cromatina se alicuotó en 3 partes iguales y se incubó con el anticuerpo anti-N-Myc (10 µg; Santa Cruz Biotechnology), el anticuerpo anti-Histona H3 (2 µg; Santa Cruz Biotechnology) o en ausencia de anticuerpo, y con 2 µg de DNA de esperma de salmón sonicado, en agitación a 4°C, durante toda la noche.

Los inmunocomplejos se capturaron mediante incubación con bolas de proteína A/G agarosa, previamente bloqueadas con DNA de esperma de salmón (0.2 µg/µl), con agitación a 4°C, durante 2 horas. Posteriormente, se realizaron tres lavados con una solución de bajo contenido en sal (NaCl 150 mM, Sacarosa al 13.5% p/v, Triton X-100 al 1 % v/v, SDS al 0.2 % p/v, NaN₃ al 0.02 % p/v, EDTA 5 mM, Tris 20 mM, pH 8), seguido de dos lavados con una solución de alto contenido en sal (NaCl 500 mM, Triton X-100 al 1% v/v, deoxicolato de sodio al 0.1 % p/v, NaN₃ al 0.2 %, EDTA 1mM y HEPES 50 mM a pH 7.5). A continuación, se realizaron 2 lavados con una solución que contenía LiCl (NP-40 al 0.5 %, deoxicolato de sodio al 0.5%, LiCl 250 mM, NaN₃ al 0.2 %, EDTA 1 mM y Tris 10 mM, pH 8). Finalmente, el último lavado se realizó con una solución de TE (Tris 10 mM y EDTA 1mM, pH 8). Los inmunocomplejos se eluyeron con una solución de SDS al 1% (p/v) y NaHCO₃ 100 mM a temperatura ambiente, con agitación durante 1 hora.

1.4 Reversión del "cross-linking" y purificación del DNA

La unión de las proteínas al DNA se revirtió mediante incubación de las muestras con NaCl 200 mM con agitación a 65°C, durante toda la noche. A continuación, las proteínas se digirieron mediante incubación con proteinasa k (20 µg; Sigma) en presencia de Tris 10 mM y EDTA 4 µM, a 45°C durante 2 h.

Finalmente, el DNA se obtuvo mediante extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), y posterior precipitación con 1ml de etanol al 100% a -80°C. Finalmente, se resuspendió en 50 µl de TE (Tris 10 mM y EDTA 1mM, pH 8).

1.5 Amplificación por PCR del DNA inmunoprecipitado

El DNA extraído (3 µl) se añadió a la mezcla de reacción compuesta por: MgCl₂ 200 µM, tampón standard 1X, dNTPs (Roche) 200 µM, oligonucleótidos 5' y 3' 0.5 µM y DNA polimerasa recombinante de *Thermus sp.* 1 U.

El resultado de la PCR correspondiente a la muestra que se inmunoprecipitó con anti-Histona H3, se utilizó como control positivo. El resultado de la PCR correspondiente a la muestra que se incubó en ausencia de anticuerpo, se utilizó para descartar posibles falsos positivos.

Las condiciones experimentales fueron las mismas para todos los cebadores utilizados: 1 x (95°C, 10 min), 38 x (95°C, 30 seg; 62°C, 30 seg; 72°C, 45 seg), 1 x (72°C, 7 min), 1 x (4°C).

Los oligonucleótidos (Tabla M-VI) se diseñaron de manera que amplificaran una región en torno a secuencias de reconocimiento E-box (canónicas o no canónicas) presentes en la región promotora de los diferentes genes estudiados. En el diseño se

tuvieron en cuenta el tamaño de la región amplificada (igual o inferior a 300 pb) y la temperatura de anillamiento (de 62°C en todos los casos), para aumentar la especificidad del resultado. Los oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen *PTMA* (protimosina- α) se utilizaron como control positivo, ya que se ha descrito que N-Myc induce su expresión (Westermann *et al.*, 2008). Como control negativo, se utilizó una pareja de oligos diseñada para amplificar una secuencia de la *Rae1* (dentro del intron 5-6) que no presentaba ninguna secuencia E-box dentro de ella ni a 2 Kb de distancia hacia ambos extremos 5' ó 3'.

Gen, Secuencia/ posición de E-box	Secuencia	Tamaño (pb)
<i>PTMA</i> , CACGTGI-334	Oligonucleótido 5':5'-ATCTTGTGTGTGGCACAGGT-3 (Slack <i>et al.</i> , 2005) Oligonucleótido 3':5'- TCGTCTCTGGAGCCAGTTGG- 3' (Slack <i>et al.</i> , 2005)	300
<i>Rae1</i> , CATGTGI-56	Oligonucleótido 5':5'- AGCGGCTACATCAACTTTGG - 3' Oligonucleótido 3':5'- CCTTAAGCCTGCGGTAGAAA - 3'	218
<i>Rae1</i> , ninguna /dentro de región amplificada	Oligonucleótido 5':5'- CCTTCCATTTCTCGTGTTC - 3' Oligonucleótido 3':5'- CTCTCCTCAATCACACACACAA - 3'	188

Tabla M-VI: Oligonucleótidos empleados en la PCR.

VIII. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los resultados se presentan como medias \pm error estándar de la media de, como mínimo, tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA). Los valores se consideraron significativos cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. Efecto del ácido *trans*-retinoico sobre la progresión del ciclo celular y el proceso de diferenciación en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y

Con objeto estudiar el mecanismo mediante del cual el RA induce la diferenciación neuronal hemos utilizado el modelo de diferenciación *in vitro* de la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Esta línea celular es el tercer subclón establecido a partir de la línea SK-N-SH, obtenida a su vez de la biopsia de médula ósea de un paciente con neuroblastoma (Biedler *et al.*, 1973). Este subclón presenta la ventaja de poseer una elevada proporción de células neuroblásticas (tipo N) que diferencian hacia un fenotipo neuronal en presencia de RA a concentraciones fisiológicas (Encinas *et al.*, 2000).

1.1 El ácido *trans*-retinoico induce la diferenciación neuronal de la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y

Nuestro primer objetivo fue corroborar los cambios morfológicos y en la expresión de marcadores neuronales en las células SH-SY5Y incubadas en medio completo (DMEM suplementado con FCS inactivado al 10%) en presencia de RA (10 μ M) durante los tiempos indicados en la Fig. 1. Así, mediante microscopía de contraste de fases observamos que el RA induce la diferenciación de las células hacia un fenotipo neuronal, como muestra la extensión progresiva de las neuritas (Fig. 1a y 1b), y la agrupación de los cuerpos celulares (Fig. 1a). Estos cambios morfológicos se acompañaron de incrementos paralelos en la expresión de diversos marcadores neuronales. Así, los niveles de marcadores de crecimiento dendrítico, Map2 (Microtubule associated protein-2), y Tau (miembro de la familia de las MAPs),

aumentaron progresivamente a lo largo del tratamiento con RA. Asimismo, la expresión del marcador de crecimiento axonal Gap43 (growth associated protein 43) fue detectable al quinto día de incubación con RA (Fig.1c).

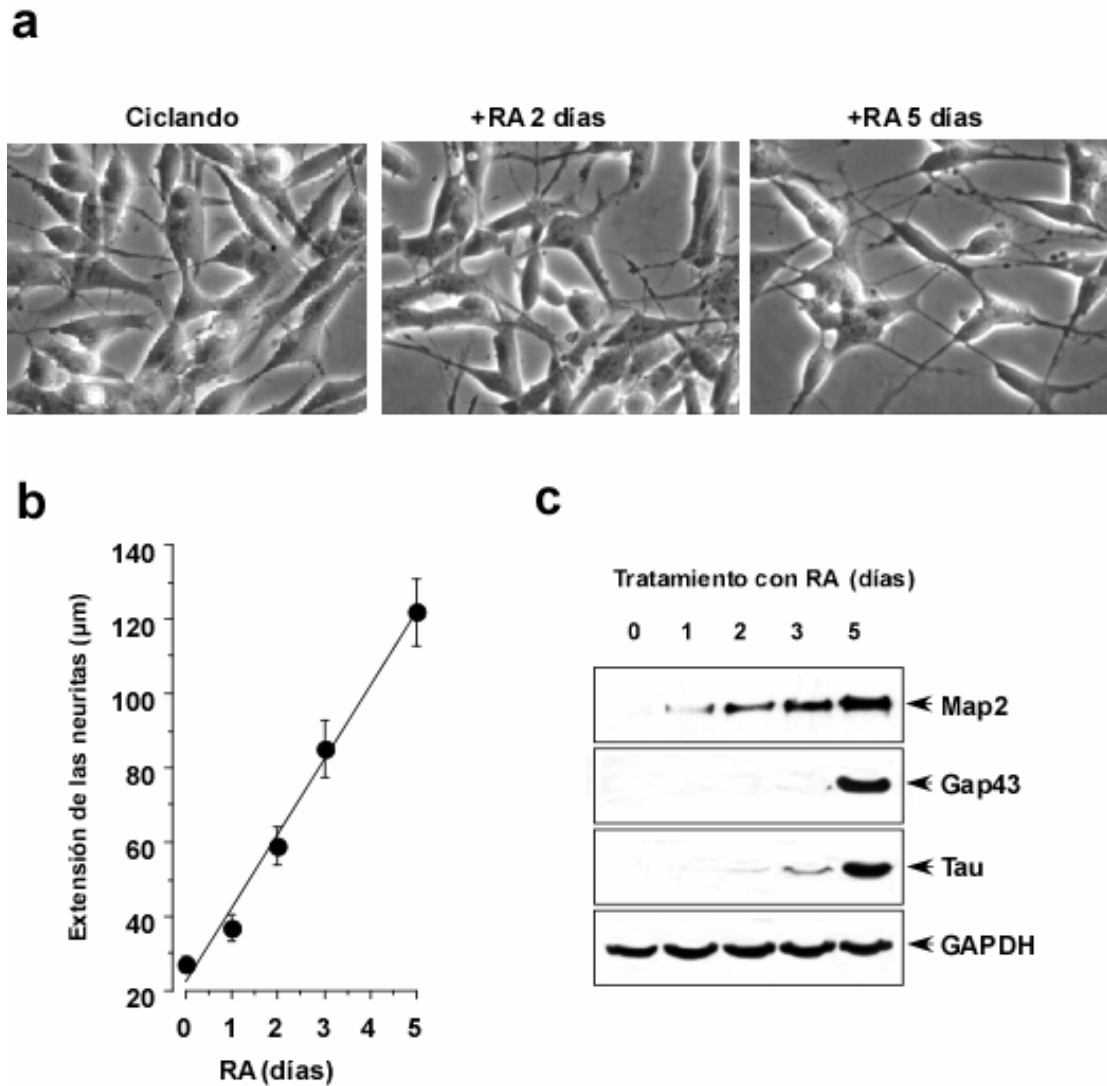


Figura 1. Caracterización de la diferenciación neuronal inducida por RA en la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y. (a) La incubación de las células SH-SY5Y con RA induce la extensión de neuritas y la agrupación de los cuerpos celulares características de neuronas post-mitóticas, como se aprecia en las imágenes de microscopía en contraste de fases. (b) El RA induce el progresivo incremento en la longitud de las neuritas, cuantificada con el software NIH image 1.61. (c) El RA incrementa la expresión de los marcadores neuronales, Map2, Gap43 y Tau, analizada mediante western blot en células SH-SY5Y a lo largo del proceso de diferenciación. GAPDH se utilizó como control de carga de proteínas. * $p < 0,05$ respecto a la condición previa correspondiente.

1.2 El RA actúa negativamente sobre la progresión del ciclo celular en las células SH-SY5Y

Por otro lado, uno de los efectos biológicos mejor caracterizados del RA es la inhibición de la proliferación celular, mediante el incremento de la expresión proteica de p27 en la fase G1 del ciclo celular (Matsuo and Thiele 1998; Nakamura *et al.*, 2003). La distribución de la población celular de la línea SH-SY5Y en las distintas fases del ciclo se determinó mediante tinción con yoduro de propidio tras incubación de las células con RA durante diferentes tiempos de incubación. Las células ciclando (no tratadas con RA) mostraron un perfil de una población en crecimiento asincrónico, con aproximadamente un 50% de la población en fase G0/G1. El tratamiento con RA incrementó la población celular en la fase G0/G1, al mismo tiempo que se produjo una paulatina disminución de la proporción de células en fase S y G2/M (Fig. 2a). Mediante western blot analizamos los niveles proteicos de PCNA (proliferating cell nuclear antigen), el estado fosforilado de pRb (ambos indicadores de progresión en fase S) y la expresión de los CKIs, p27 y p21, como marcadores de fase G0/G1. Así, la expresión de PCNA disminuyó progresivamente como consecuencia del tratamiento con RA; y la hiperfosforilación de pRb (forma inactiva de la proteína) también disminuyó con el tratamiento con RA hasta desaparecer a los 5 días (Fig. 2b). Por el contrario la expresión de los CKIs ensayados, p21 y p27, se incrementó a medida que transcurría el proceso de diferenciación (Fig.2b). Por tanto, el tratamiento con RA induce la parada de las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y en la fase G0/G1 del ciclo celular, así como su diferenciación a neuronas post-mitóticas, en concordancia con estudios previos (Encinas *et al.*, 2000; Almeida *et al.*, 2005)

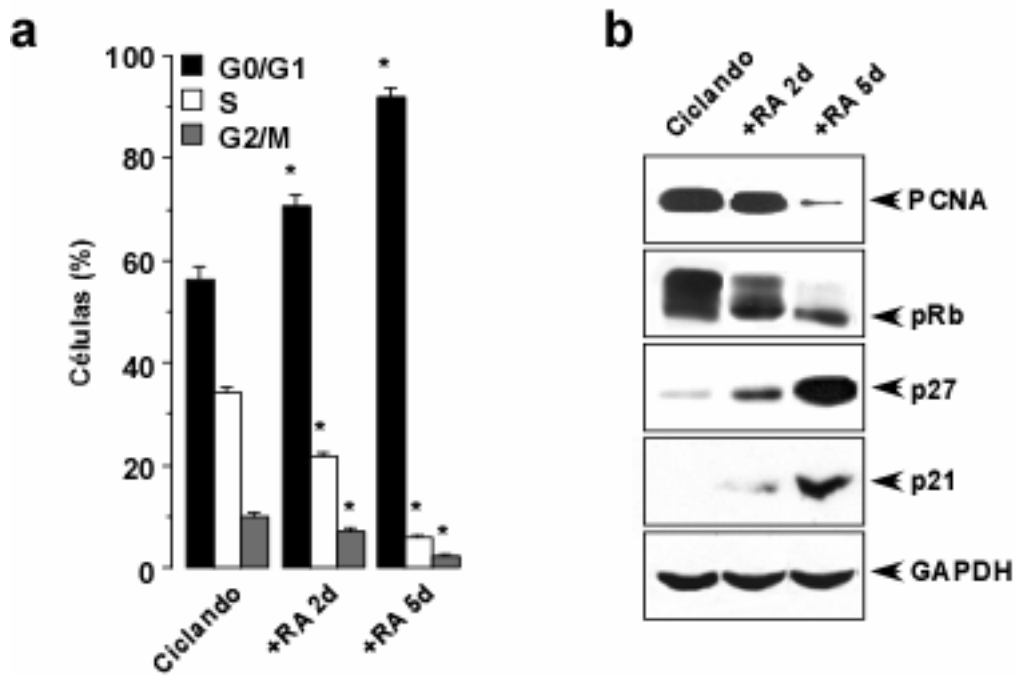


Figura 2. Efecto del RA sobre la distribución de las células SH-SY5Y en las diferentes fases del ciclo celular. (a) En las células SH-SY5Y incubadas a distintos tiempos con RA (ciclando, 2 y 5 días), se observó un progresivo incremento en la población celular en fase G0/G1 mediante tinción con yoduro de propidio y posterior análisis por FACS. (b) El RA disminuye los niveles proteicos de PCNA y el estado fosforilado de pRb, a la vez que incrementa la expresión proteica de p27 y p21, analizados mediante western blot. * $p < 0,05$ anterior correspondiente.

p27 es un regulador crítico en la progresión de la fase G1 del ciclo celular debido a que interacciona con los complejos ciclina E/A-Cdk2, inhibiendo su actividad (Polyak *et al.*, 1994). El contenido celular de p27 se regula por mecanismos post-traduccionales y de degradación dependiente del proteasoma (Pagano *et al.*, 1995). Recientemente se ha demostrado que la degradación nuclear requiere la fosforilación previa de p27 en el residuo Ser10 (Borriello *et al.*, 2006), lo que permite ser reconocido y poliubiquitinado por el complejo SCF-Skp2 en la transición entre las fase G1 a S (Carrano *et al.*, 1999). Dado que en muchos cánceres humanos la expresión proteica de p27 está disminuida (Bloom and Pagano 2003) como consecuencia de una potenciación de su proteólisis a través del complejo SCF-Skp2, decidimos estudiar la

posible correlación inversa entre la expresión de Skp2 y de p27 durante la diferenciación de las células SH-SY5Y inducida por el RA. Así, observamos que las células ciclando expresaban profusamente Skp2 en el extracto celular total, lo que concuerda con los datos publicados previamente (Bell *et al.*, 2007) y en la fracción nuclear (Fig. 3a y 3b). El tratamiento con RA indujo un descenso progresivo de Skp2 sin afectar la expresión de Skp1, constituyente del complejo SCF, como se observa en la Fig. 3a. En los extractos nucleares de las células SH-SY5Y observamos que el RA incrementó los niveles de p27 de manera inversamente proporcional a la disminución de los niveles de Skp2 (Fig. 3b) como ya se ha descrito anteriormente en otras líneas de neuroblastoma (Borriello *et al.*, 2006).

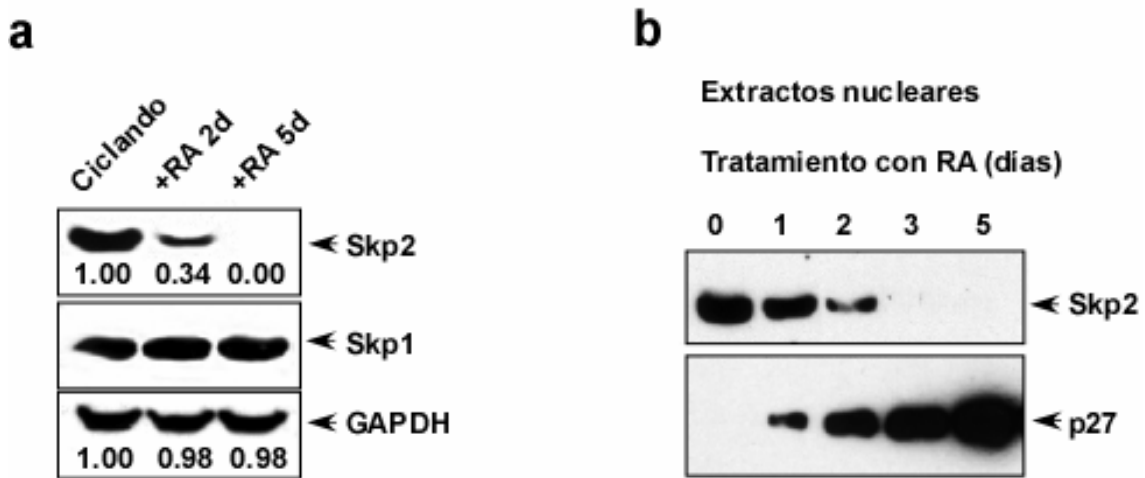


Figura 3. Estudio de la expresión de p27 y Skp2 durante la diferenciación neuronal de las células SH-SY5Y inducida por RA. (a) Los niveles proteicos de Skp2, pero no de Skp1, disminuyeron según muestra el análisis mediante western blot a distintos tiempos de incubación con RA (0, 2 y 5 días). (b) El RA induce la degradación de Skp2 y la acumulación concomitante de p27 en el núcleo de las células SH-SY5Y.

1.3 Implicación de Skp2 en la diferenciación neuronal y parada en fase G0/G1

inducida por RA en las células SH-SY5Y.

Para poder analizar con mayor profundidad la función de la degradación de la proteína Skp2 en la parada de las células SH-SY5Y en fase G0/G1 inducida por RA, quisimos modificar la expresión de Skp2 mediante la transfección transitoria de las células con el cDNA completo de Skp2 (generosamente donado por el Prof. M. Pagano) o con el cDNA completo de Skp2 Δ db, que da lugar a una proteína activa pero insensible a la degradación en la fase G1 dado que carece de la caja D (Wei *et al.*, 2004).

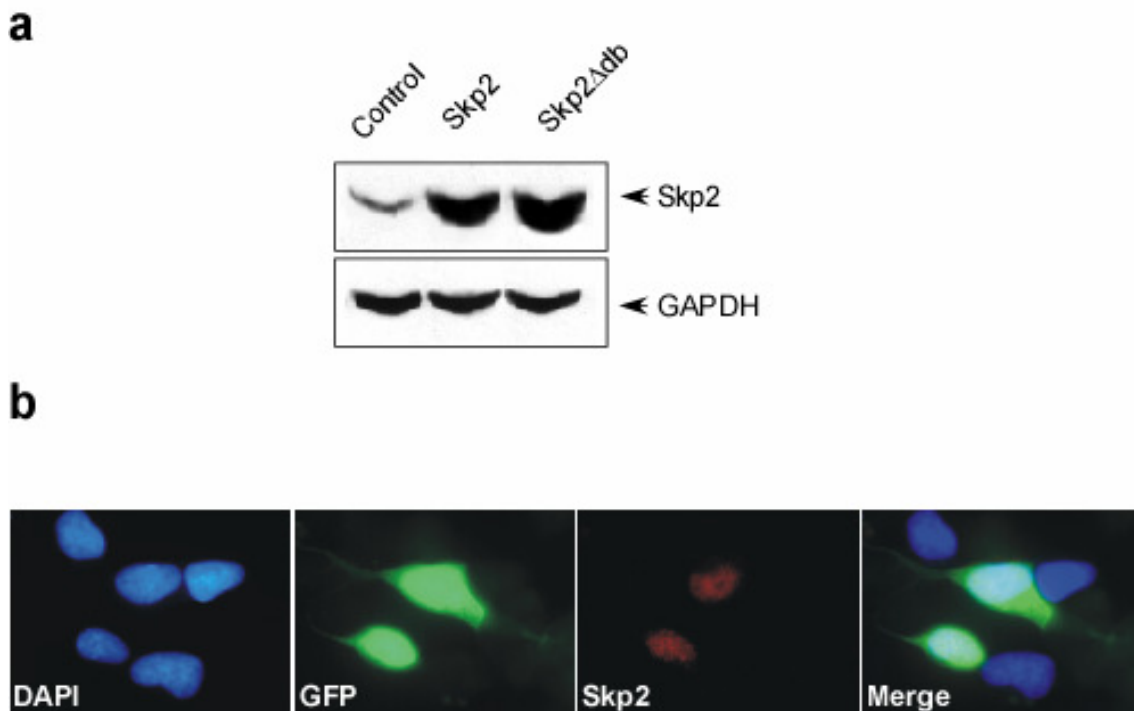


Figura 4. Incremento en los niveles de Skp2 mediante transfección con el cDNA completo de Skp2 y de Skp2 Δ db. (a) El mayor aumento de los niveles proteicos de Skp2, analizado mediante western blot, se detectó en células SH-SY5Y transfectadas con el cDNA de de Skp2 Δ db, 48 horas post-transfección (b) Mediante inmunocitoquímica se detectó la expresión de Skp2 (rojo) en el núcleo (tinción con DAPI) de las células SH-SY5Y ciclando transfectadas eficientemente con el cDNA de Skp2 (GFP+).

Para ello, las células se transfectaron con el vector pIRES2eGFP (control), el vector pIRESeGFP-Skp2 (Skp2) o el vector pIRESeGFP-Skp2 Δ db (Skp2 Δ db). Tras 48 horas, observamos que la transfección con el cDNA de Skp2 Δ db dio lugar a un mayor incremento en los niveles de Skp2 (Fig. 4a). Mediante inmunocitoquímica pudimos detectar la expresión de Skp2 en el núcleo de las células eficientemente transfectadas (GFP+) (Fig. 4b).

La sobreexpresión de Skp2 provocó un incremento significativo en el porcentaje de células en fase S del ciclo celular, determinada por FACS tanto por tinción con yoduro de propidio como por incorporación de BrdU (Fig. 5a y 5b). Dicho incremento resultó ser mayor en las células que expresaban Skp2 Δ db. El RA previno el incremento de el porcentaje de células en fase S producido por la sobreexpresión de Skp2. Sin embargo, el RA no produjo ningún efecto significativo en las células que sobreexpresaban Skp2 Δ db (Fig. 5b).

Mediante el análisis de las proteínas por western blot pudimos comprobar que la sobreexpresión de Skp2 Δ db, pero no la de Skp2, previno totalmente la disminución de los niveles de Skp2, el incremento de p27 y la expresión de Map2 producida por el RA (Fig. 5c). Es más, Skp2 Δ db, pero no Skp2, previno el incremento en la extensión de las neuritas producido por RA en las células SH-SY5Y (Fig.5d). Por tanto, la degradación de Skp2 producida por el RA es esencial para la diferenciación neuronal de las SH-SY5Y.

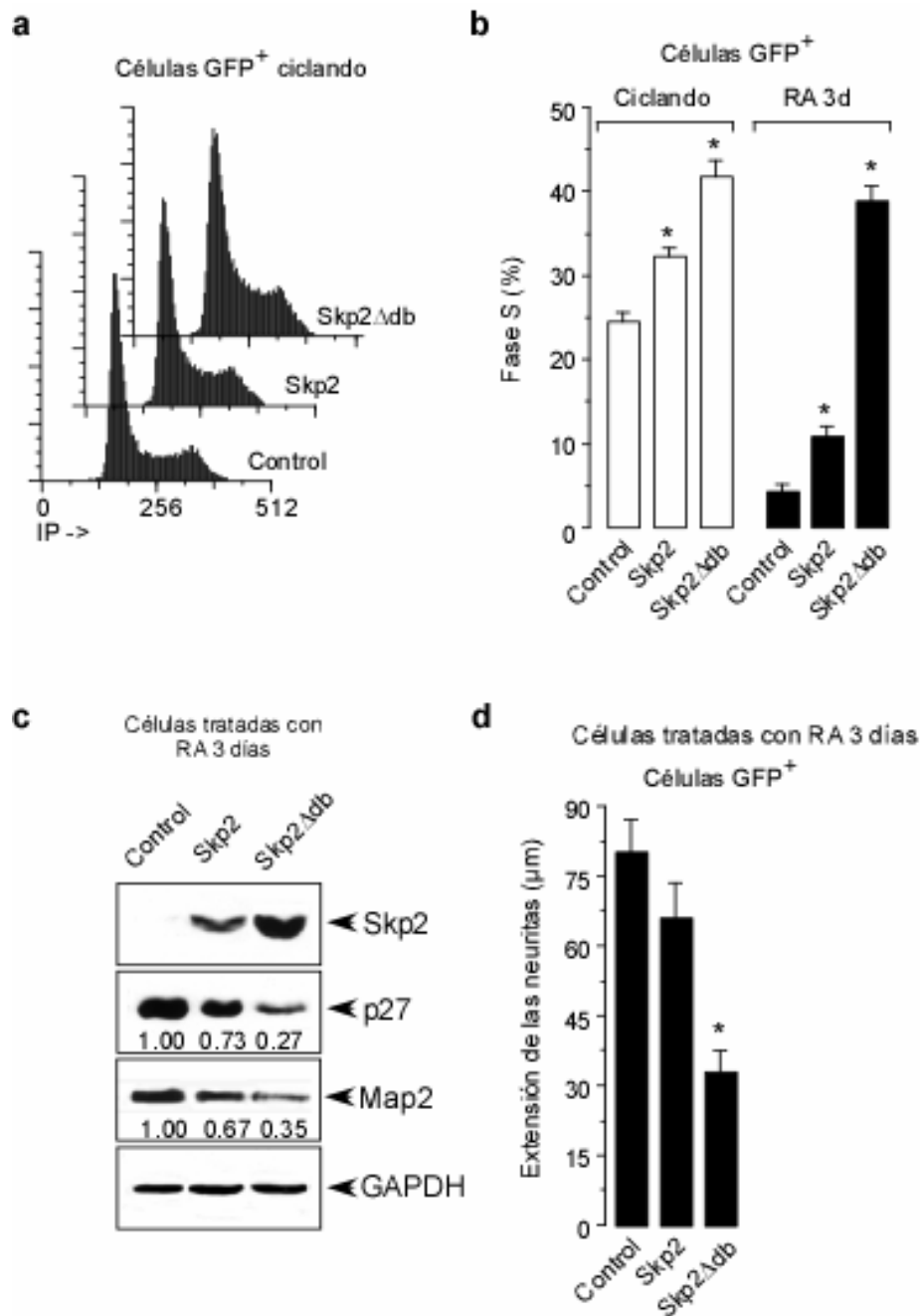


Figura 5. El incremento de la forma mutada, no degradable, Skp2Δdb, impide la parada de las células SH-SY5Y en la fase G0/G1 del ciclo celular y en el proceso de diferenciación inducido por RA. (a) En Las células SH-SY5Y transfectadas con el cDNA de Skp2Δdb se observó un aumento de la población celular en fase S, determinada mediante tinción con yoduro de propidio y posterior análisis por FACS. (b) Proporción de células transfectadas (GFP+) en fase S, analizada antes y después del tratamiento con RA durante 3 días SH-SY5Y mediante incorporación de BrdU y análisis por FACS. (c) La transfección de las células SH-SY5Y con el cDNA de la forma mutada no degradable, Skp2Δdb, disminuye la acumulación de p27 y la expresión proteica de Map2, (d) además del crecimiento de las neuritas. *p< 0,05 anterior correspondiente.

1.4 Función de APC/C-Cdh1 en la regulación de la expresión de Skp2 durante la diferenciación de las células SH-SY5Y con RA

Una vez demostrado que el RA disminuye los niveles de Skp2 en las células SH-SY5Y, decidimos estudiar la variación de los niveles de mRNA de la proteína en las mismas condiciones experimentales.

Sorprendentemente, observamos que el mRNA de Skp2 permaneció constante, al menos hasta los 5 días de tratamiento con RA (Fig.6a), lo que no concordaba con su expresión proteica (Fig.3b).

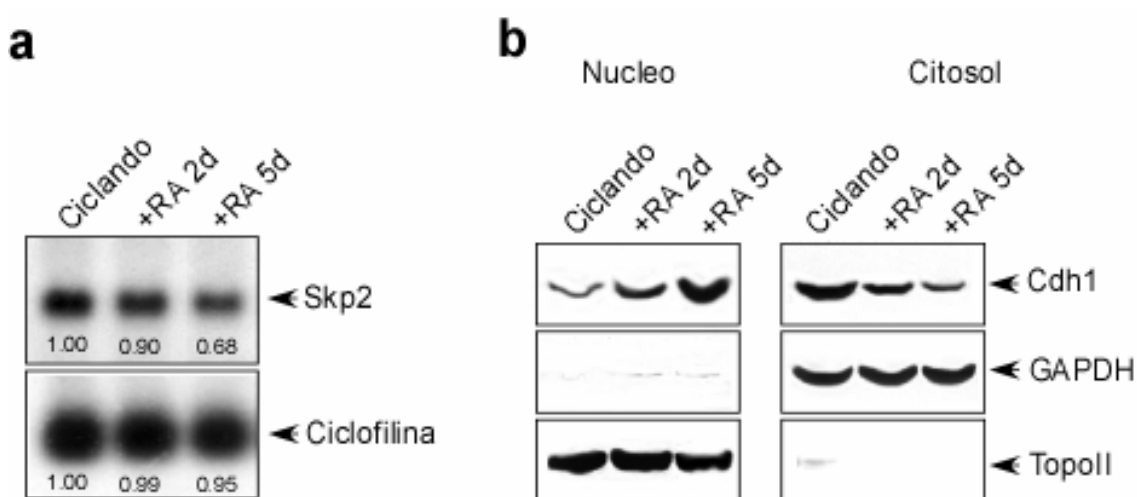


Figura 6. Efecto del RA en la expresión de Skp2 y en la distribución subcelular de Cdh1. (a) Análisis de la expresión de *SKP2*, mediante Northern blot, en las células SH-SY5Y en ausencia de tratamiento con RA (10 μ M) (ciclando) y a los 2 y 5 días de incubación. Nótese que los niveles de mRNA de Skp2 no desaparecieron tras 5 días de incubación con RA. (b) Cdh1 se acumuló progresivamente en el núcleo, al mismo tiempo que disminuyó en el citosol durante la diferenciación de las células SH-SY5Y inducida por el RA. La ciclofilina se utilizó como control de carga de RNA. Topoisomerasa II α (Topo II) y GAPDH se emplearon como control del protocolo de fraccionamiento.

Estos resultados sugerían una regulación post-transcripcional de Skp2 inducida por el RA. Estudios previos de otros grupos han demostrado que la degradación de

Skp2 durante la fase G1 se produce a través del proteasoma, previa ubiquitinación a cargo de la E3 ubiquitina ligasa APC/C activada por Cdh1 (Bashir *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2004).

Dado que el activador de APC, Cdh1, pero no Cdc20, se acumula en neuronas post-mitóticas (Almeida *et al.*, 2005), decidimos investigar la posible implicación de APC/C-Cdh1 en la diferenciación neuronal inducida por el RA. En primer lugar, determinamos los niveles de Cdh1 en el núcleo y citosol de las células SH-SY5Y tratadas con RA durante 2 ó 5 días. Como se observa en la Fig. 6b, el RA indujo la acumulación progresiva de Cdh1 en el núcleo de las células, a la vez que sus niveles disminuyeron en el citosol.

1.4.1 Efecto de la inhibición de la actividad de APC/C-Cdh1 sobre la diferenciación neuronal inducida por el RA.

Con objeto de inhibir la actividad de APC/C-Cdh1, decidimos disminuir los niveles de Cdh1 mediante RNA de interferencia. Para ello, las células se transfectaron con el vector pSuper neo/gfp-Cdh1 (Almeida *et al.*, 2005) que coexpresa la proteína GFP y el shRNA contra Cdh1 (Cdh1shRNA). El silenciamiento de Cdh1 provocó un incremento de los niveles de expresión de Skp2 y PCNA (Fig. 7a). Dichos incrementos se acompañaron de un aumento del porcentaje de células en fase S del ciclo celular (Fig. 7b). Así mismo, observamos que la transfección de las células con el shRNA contra Cdh1, identificadas mediante la expresión de GFP previno la expresión de Map2 causada por el RA, como se muestra en la inmunofluorescencia (Fig. 8). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores (Bashir *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2004; Binne *et al.*, 2007), ya que la actividad de APC/C-Cdh1 impide la progresión

de las células desde la fase G1 a la fase S, como consecuencia de la degradación de Skp2.

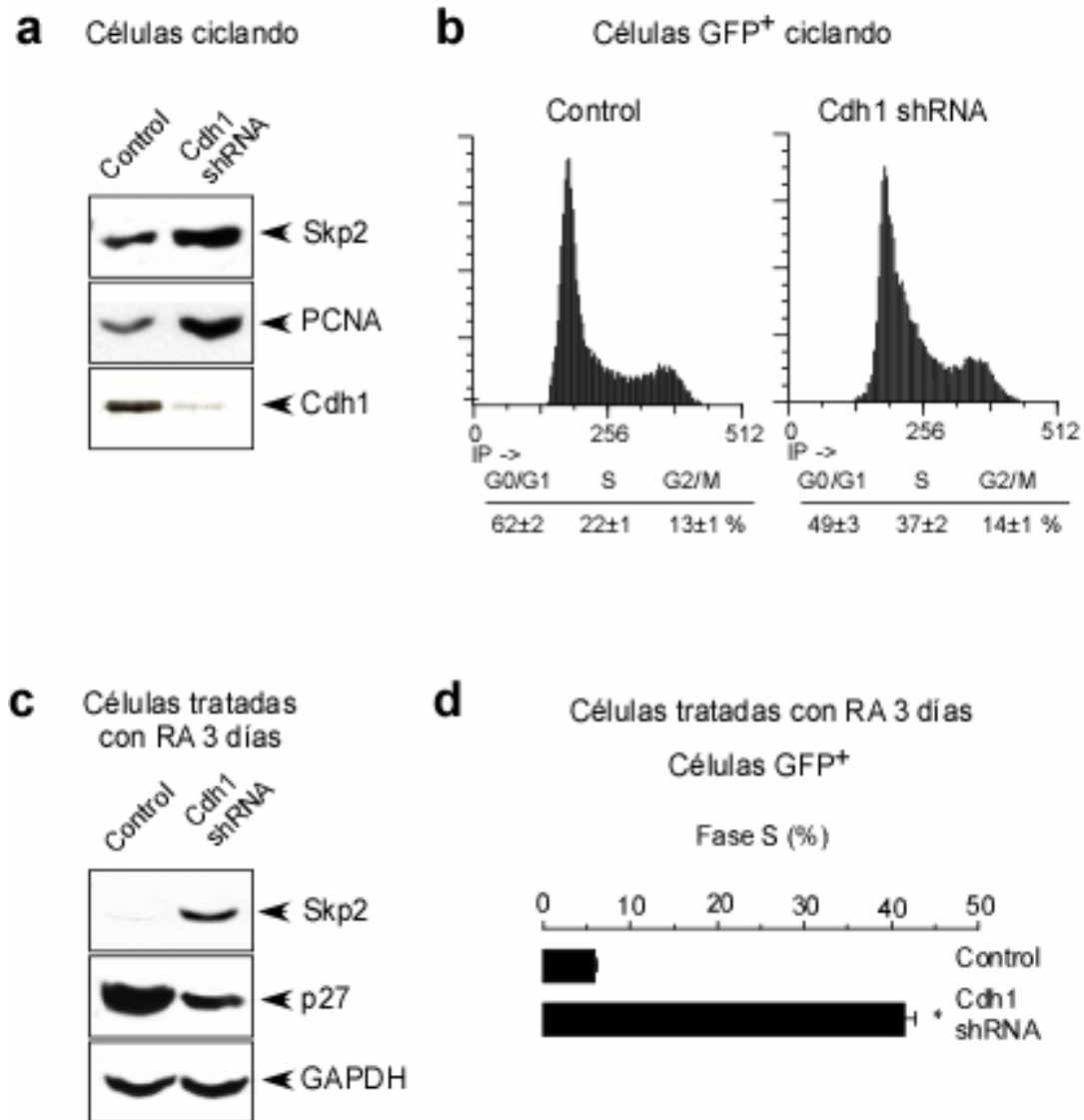


Figura 7. Cdh1 interviene en la acumulación de p27 y la parada del ciclo celular inducida por RA, a través de la degradación de Skp2. (a) Las células SH-SY5Y transfectadas con el vector pSuper.neo/gfp-Cdh1 (Cdh1 shRNA) mostraron un incremento en los niveles de Skp2 y PCNA y (b) de la población celular en fase S, disminuyendo la población detenida en fase G0/G1, a los tres días post-transfección. (c) El shRNA contra Cdh1 en células SH-SY5Y ciclando incrementó los niveles de Skp2, lo que indujo la degradación de p27, tras 3 días de tratamiento con RA. (d) La disminución de la expresión de Cdh1 previno el descenso del porcentaje de células en fase S (marcadas con BrdU), inducido por RA. * $p < 0,05$ respecto a la condición previa correspondiente.

Es más, el silenciamiento de Cdh1 impidió la acumulación de p27, la degradación de Skp2, y la subsecuente disminución del porcentaje de células en fase S causada por el RA. Por tanto, Cdh1 es esencial para promover la salida del ciclo celular causada por el RA en células de neuroblastoma humano.

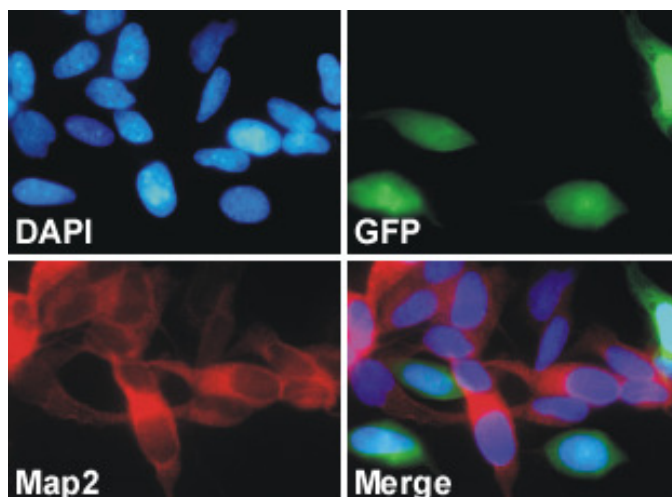


Figura 8. Efecto del silenciamiento de Cdh1 sobre la expresión de Map2. (a) La expresión de Map2 inducida por RA se previno al disminuir los niveles de Cdh1 mediante RNA de interferencia (células GFP+ identifican la transfección con pSuper.neo/gfp-Cdh1).

1.4.2 Inhibición de la actividad del complejo APC/C-Cdh1 por hEmi1

Con objeto de comprobar que los efectos observados tras el silenciamiento de Cdh1 eran consecuencia de la inactivación del complejo APC/C, utilizamos el conocido inhibidor del mismo, hEmi1 (Reimann *et al.*, 2001b; Hsu *et al.*, 2002). La sobreexpresión de hEmi1 en las células SH-SY5Y provocó la acumulación de Skp2 y PCNA, el incremento del porcentaje de células en fase S y la disminución de la población detenida en fase G0/G1 (Fig. 9a y 9b). Así mismo, y de manera similar a los resultados obtenidos al silenciar Cdh1, observamos que hEmi1 previno la disminución

de p27 (Fig. 9c) y del porcentaje de células que entraban en fase S (Fig. 9d), causados durante la diferenciación neuronal inducida por el RA.

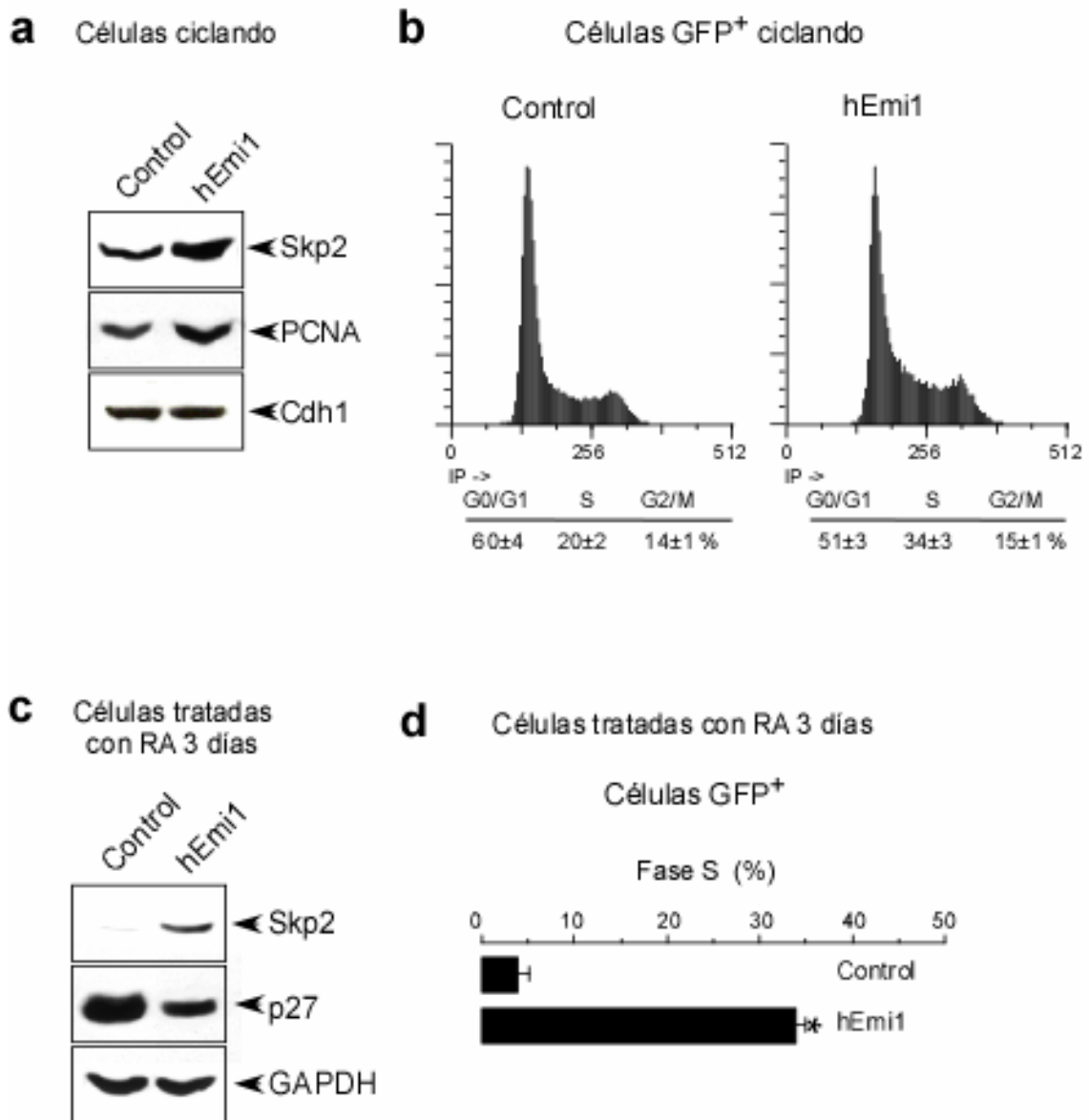


Figura 9. Inhibición de la actividad de APC/C-Cdh1 mediante hEmi1. (a) Las células SH-SY5Y transfectadas con el inhibidor hEmi1 mostraron un incremento en los niveles proteicos de Skp2 y PCNA. (b) hEmi1 indujo el aumento de la población celular en fase S, descendiendo la población en fase G0/G1 en las células SH-SY5Y. (c) La expresión de hEmi1 previno la degradación de Skp2 y la acumulación de p27 inducida por el RA. (d) hEmi1 previno el descenso en el porcentaje de células en fase S, tras la incubación con el RA. *p < 0,05 respecto a la condición previa correspondiente.

En conjunto, estos resultados indican que la salida del ciclo celular y diferenciación desencadenada por el tratamiento con el RA implican la acumulación nuclear de Cdh1, que actúa marcando a Skp2 para su posterior degradación, lo cual permite la acumulación de p27.

Con objeto de analizar si los cambios en los niveles de las proteínas estudiadas ocurrían durante la diferenciación neuronal, realizamos una aproximación metodológica más fisiológica. Para ello, utilizamos neuronas corticales de rata sometidas a diferenciación mediante incubación en medio de cultivo compuesto por NEUROBASAL™ Medium suplementado con B-27 al 2% y glutamina 0,5 mM. En la Fig. 10a se observa que a los 5 días de cultivo, las neuronas presentan un gran desarrollo de las neuritas y agrupación de los cuerpos neuronales, lo que indica diferenciación neuronal (Almeida *et al.*, 2005). Es más, la expresión de los niveles de Cdh1 se mantuvo alta hasta el quinto día de cultivo (Fig. 10b), mientras que se incrementó la degradación de Skp2 y la subsecuente estabilización de p27, coincidiendo dichos cambios con un incremento en la expresión de Map2 (Fig. 10b). Estos resultados corroboraron que la regulación del eje Cdh1-Skp2-p27 desempeña una importante función durante la diferenciación neuronal.

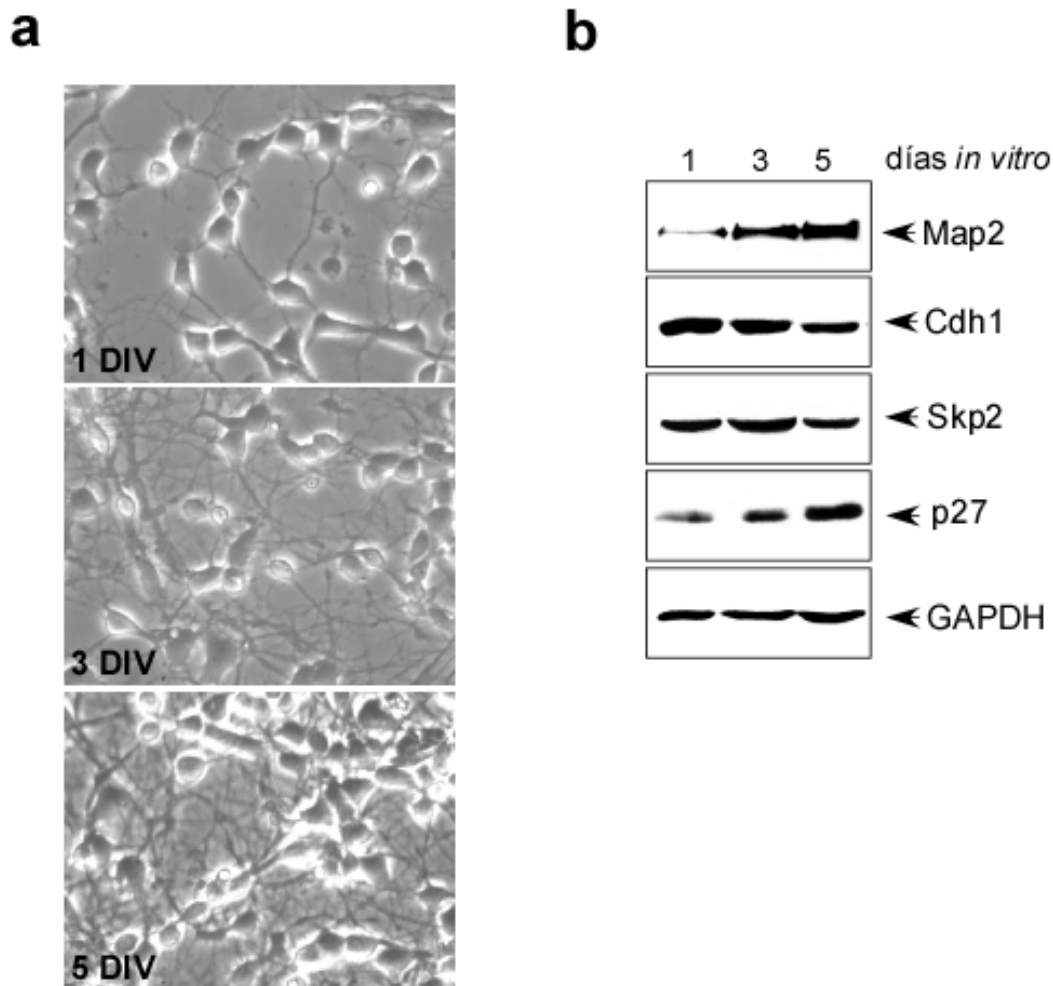


Figura 10. Expresión de Cdh1, Skp2 y p27 durante la diferenciación de neuronas corticales en cultivo primario. (a) Imágenes de microscopía en contraste de fases de neuronas corticales en cultivo primario a lo largo del proceso de diferenciación (1, 3 y 5 días *in vitro*). (b) Los análisis, mediante western blot, confirmaron que el incremento en los niveles de p27 coincide con la caída de los niveles de Skp2, al mismo tiempo que aumenta la expresión de Map2 en las neuronas corticales.

1.4.3 Efecto del complejo Rae1-Nup98 en la actividad de APC/C-Cdh1

Recientemente, se ha descrito que el complejo Rae1-Nup98 bloquea la actividad de APC/C-Cdh1 durante prometafase (Jeganathan *et al.*, 2005). Motivados por esta observación, y con objeto de estudiar si dicho complejo regulaba la actividad de APC/C-Cdh1 durante la diferenciación neuronal, decidimos analizar los niveles de

Rae y Nup98 en las células SH-SY5Y inducidas a diferenciar mediante tratamiento con RA. Así observamos que el RA provocó la degradación de la proteína Rae1, pero no la de Nup98, y de manera similar el descenso de sus niveles de mRNA (Fig. 11a y 11b). Estos resultados sugieren que el RA podría reprimir la expresión génica de *RAE1*.

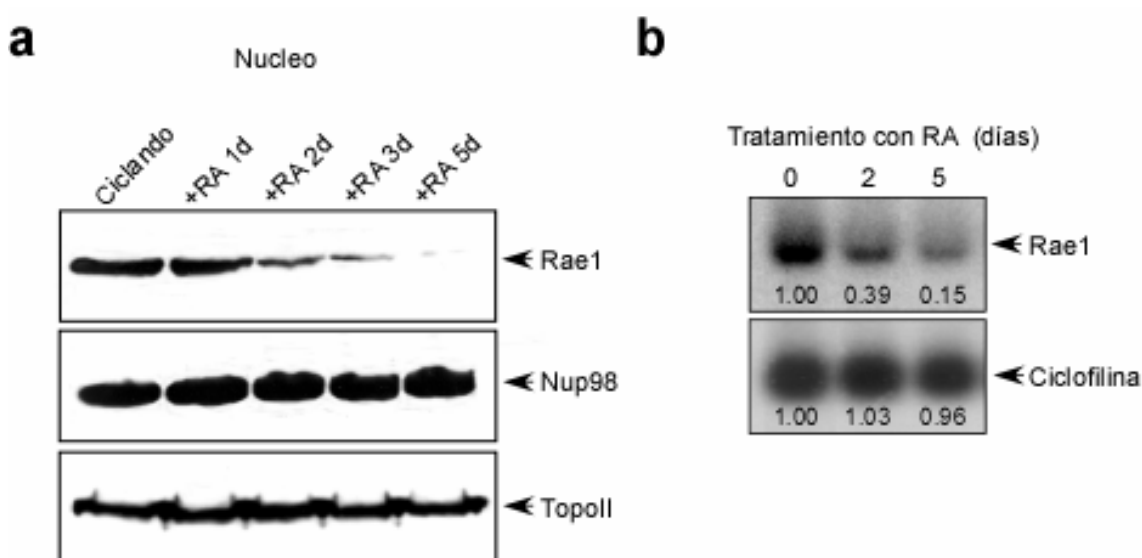


Figura 11. El RA inhibe la expresión de Rae1. (a) El RA indujo el descenso de los niveles proteicos de Rae1, sin afectar los de Nup98, en el núcleo. (b) Asimismo, el tratamiento con RA disminuyó los niveles de mRNA de Rae1, analizados mediante northern blot. La topoisomerasa II α (Topo II) y la ciclofilina se utilizaron como control de carga de proteínas y RNA respectivamente.

1.4.3.1 Efecto del aumento de la expresión de Rae1 en la actividad de APC/C-Cdh1

Una vez demostrado que la diferenciación neuronal inducida por el RA produce inhibición de la expresión de Rae1, decidimos estudiar la función de esta proteína durante dicho proceso. Así las células SH-SY5Y se transfectaron con el cDNA de Rae1, lo que desencadenó la acumulación de Skp2 (Fig.12a) e incrementó el

porcentaje de células en fase S, descendiendo la población celular que se detenía en la fase G0/G1 (Fig. 12b). Asimismo, para investigar la función de Rae1 en la diferenciación, las células se incubaron con RA durante tres días tras la sobreexpresión de Rae1. Como se observa en la Fig. 12c, Rae1 impidió la degradación de Skp2 y la acumulación de p27 provocada por el tratamiento con RA, a la vez que se incrementó la población de células en al fase S (Fig. 12d).

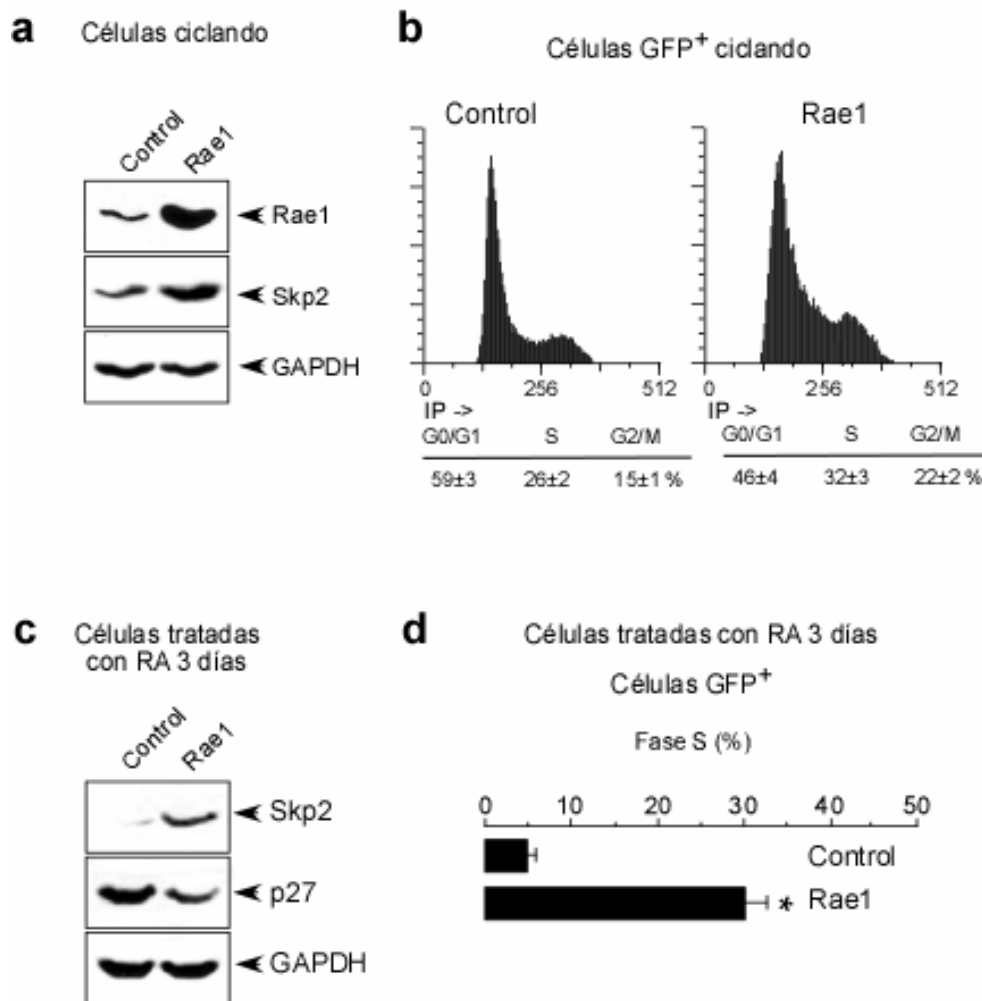


Figura 12. Rae1 previene la degradación de Skp2. (a) Las células transfectadas con el cDNA completo de Rae1 mostraron un incremento de los niveles de Skp2, 24 horas post-transfección. (b) Asimismo, se observó un aumento de la población celular en fase S en las células SH-SY5Y. (c) El aumento de la expresión de Rae1 aumentó los niveles de Skp2, disminuyendo los de p27 en células SH-SY5Y, tratadas con RA durante 3 días. (d) El incremento en los niveles de Rae1 indujo un aumento del porcentaje de células en fase S, determinada mediante tinción con BrdU. *p < 0,05 respecto a la condición previa correspondiente

1.4.3.2 Efecto de la disminución de la expresión de Rae1 en la actividad de APC/C-Cdh1

Con objeto de investigar el efecto de la ausencia de Rae1, decidimos reducir los niveles de su proteína mediante transfección transitoria empleando un siRNA específico contra Rae1 (Blower *et al.*, 2005), utilizando como control un siRNA contra la luciferasa. Como se observa en la Fig. 13, el tratamiento con el siRNA contra Rae1 disminuyó considerablemente la expresión de la proteína en las células SH-SY5Y ciclando a la vez que desencadenó la acumulación de p27 (Fig. 13a), el incremento en la población celular en fase G0/G1 y la disminución en el porcentaje de células en fase S y M (Fig. 13b).

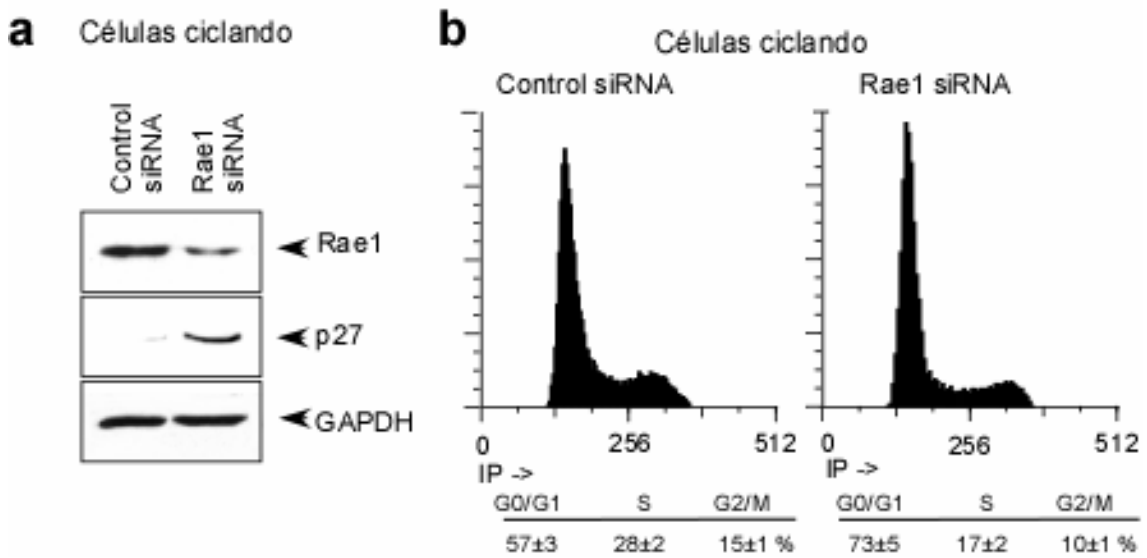


Figura 13. El silenciamiento de Rae1 provoca la acumulación de p27 e induce la parada del ciclo celular. (a) La disminución de los niveles proteicos de Rae1, mediante el uso de un siRNA específico, incrementó los niveles de p27 en células SH-SY5Y ciclando, (b) desencadenando la parada del ciclo celular en fase G0/G1.

Con objeto estudiar el posible efecto de la disminución prematura de Rae1 en el proceso de diferenciación neuronal, las células SH-SY5Y transfectadas con el

siRNA específico contra Rae1 se incubaron con RA durante 2 días. El silenciamiento de Rae1 provocó la aceleración del proceso de diferenciación a juzgar por el aumento de la extensión de las neuritas (Fig. 14a y 14b), y el incremento de los niveles proteicos de p27 y Map2, analizados mediante western blot (Fig. 14c).

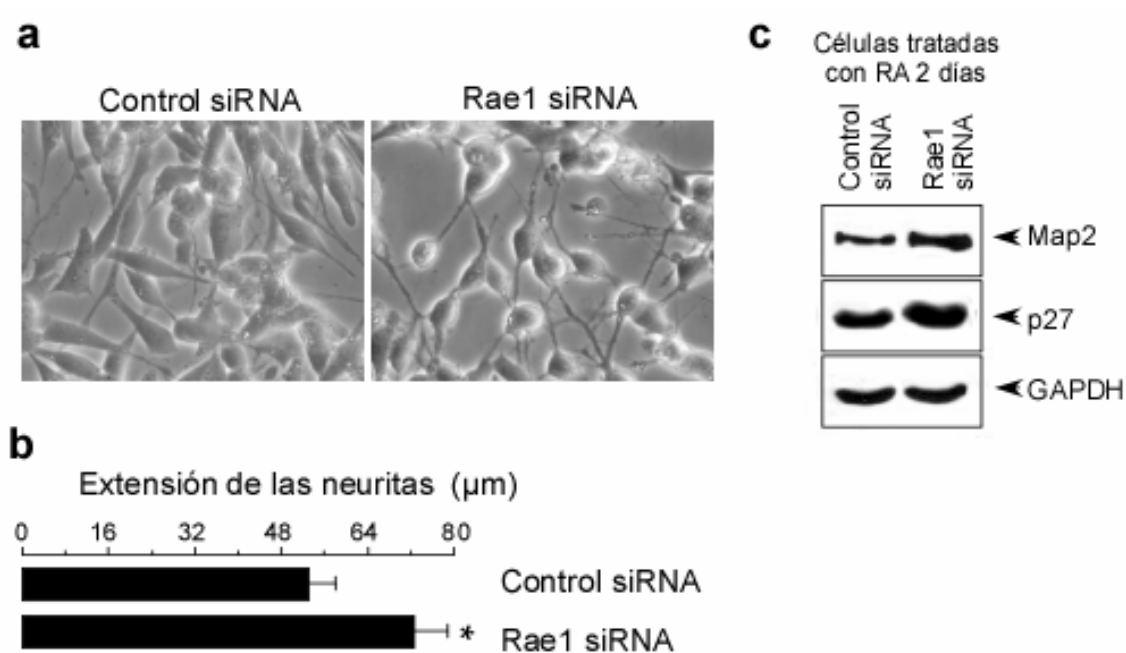


Figura 14. La disminución de la expresión de Rae1 acelera la diferenciación neuronal inducida por RA. (a) y (b) Las células SH-SY5Y transfectadas con el siRNA específico contra Rae1 e incubadas con RA durante 2 días mostraron un incremento en la extensión de las neuritas, (c) acompañado del aumento de la expresión de Map2 y la acumulación de p27. * $p < 0,05$ respecto a control siRNA.

Finalmente, y con objeto de corroborar si Rae1 tiene alguna función importante en la regulación de la diferenciación neuronal, decidimos analizar los niveles de la proteína en neuronas corticales en cultivo primario. Como se observa en la Fig. 15, los niveles de Rae1 descendían a partir del sexto día del proceso de diferenciación, coincidiendo con una disminución paralela de Skp2, un incremento de los niveles de p27, que permanecen constantes en los días analizados posteriormente.

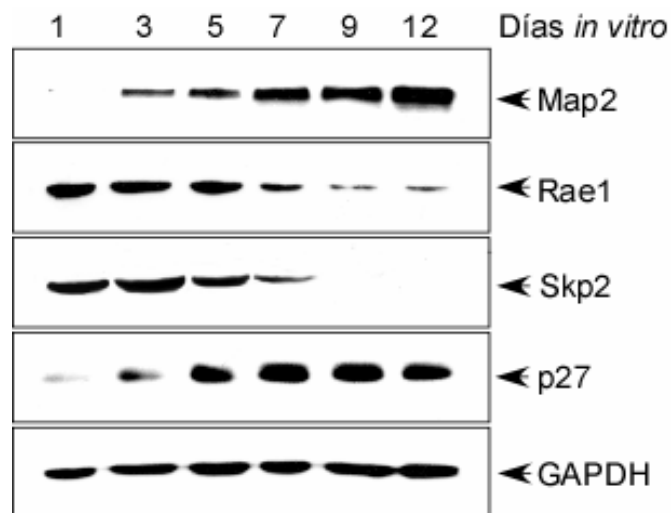


Figura 15. Expresión proteica de Rae1 disminuye durante la diferenciación de neuronas corticales en cultivo primario. Las neuronas obtenidas a partir de cerebros de fetos de 16 días de gestación se mantuvieron en medio sin suero compuesto por NEUROBASAL™ Medium suplementado con B-27 al 2% y glutamina 0,5 mM durante 12 días. El análisis mediante western blot corroboró el descenso de los niveles de Rae1 a lo largo del proceso de diferenciación neuronal, al mismo tiempo que se acumulan los niveles de p27

En conjunto, estos resultados indican que la disminución de Rae1 es necesaria para el proceso de diferenciación neuronal.

2. Efectos del ácido *trans*-retinoico en otras líneas celulares de neuroblastoma humano.

Teniendo en cuenta los resultados observados en la línea de neuroblastoma SH-SY5Y y el cultivo primario de neuronas, nuestro siguiente objetivo fue investigar si la variación de la expresión proteica de Rae1, Cdh1 y Skp2 es un proceso universal, y, por tanto, extensible a otras líneas de neuroblastoma humano en respuesta al RA.

2.1 Tratamiento con RA de la línea celular de neuroblastoma humano, SK-N-SH

La línea celular de neuroblastoma humano SK-N-SH, formada por dos tipos celulares: uno neuroblástico y otro con apariencia epitelial, poseen la capacidad de diferenciar hacia un fenotipo neuronal en respuesta a diversos inductores de la diferenciación, entre los que se encuentra el RA (Pahlman *et al.*, 1981; Ross *et al.*, 1983; Edsjo *et al.*, 2004). En nuestras condiciones experimentales, el tratamiento de las células SK-N-SH con RA (10 μ M) dio lugar a la aparición de células con fenotipo neuronal, a juzgar por el incremento de la extensión de neuritas (Fig. 16a). Además, pudimos corroborar mediante western blot, que durante este proceso los niveles de Cdh1 permanecían constantes, contrariamente a lo que sucedía con Skp2 y Rae1, que disminuían paulatinamente, mientras se incrementaban los niveles de p27 (Fig. 16b), hasta los tres días de tratamiento con el RA.

Dado que la incubación con RA dio lugar a un descenso de los niveles proteicos de Rae1, al igual que habíamos observado en las células SH-SY5Y,

quisimos estudiar la evolución de los niveles de mRNA. Así, observamos un progresivo descenso en la expresión de Rae1, mediante RT-PCR semicuantitativa (Fig. 16c).

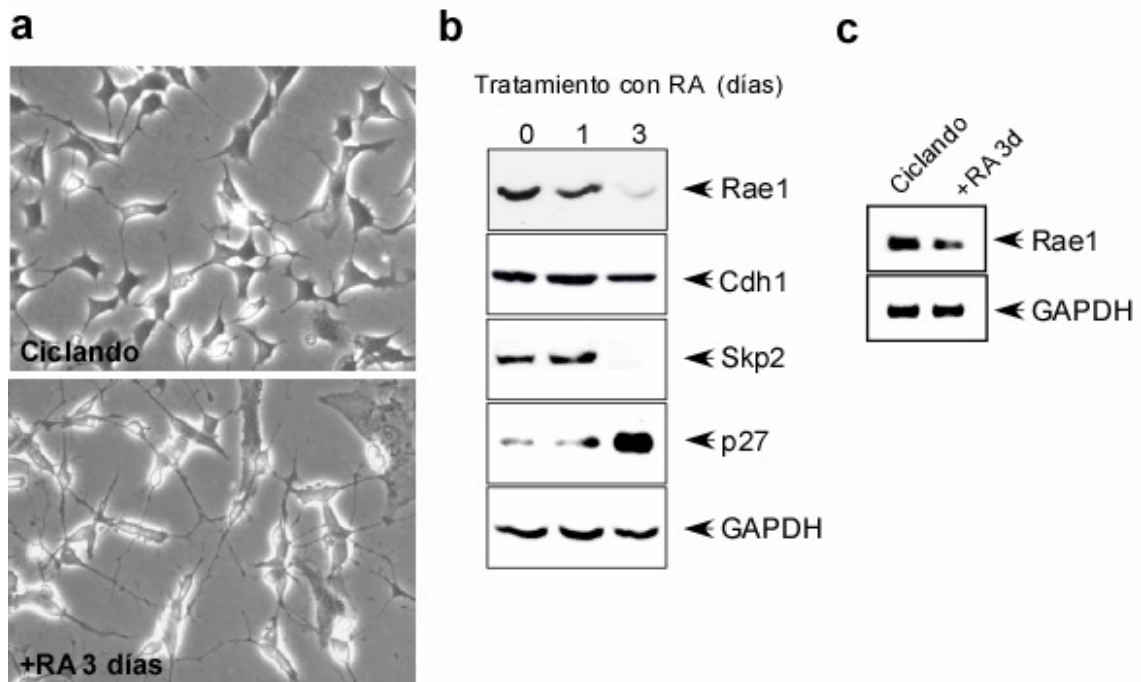


Figura 16. El RA induce la diferenciación neuronal de la línea de neuroblastoma SK-N-SH a través de la disminución de Rae1. (a) Imágenes de microscopía en contraste de fases de las células SK-N-SH a diferentes días de tratamiento con RA. (b) El análisis mediante western blot, reveló la disminución de los niveles proteicos de Rae1, y Skp2, así como la acumulación de p27. Los niveles de Cdh1 no resultaron alterados por el tratamiento con RA. (c) Los niveles de mRNA de Rae1, analizados mediante RT-PCR semicuantitativa, disminuyeron en respuesta al tratamiento con RA durante 3 días. La proteína GAPDH se empleó como control de carga de proteínas, y la amplificación de un fragmento de 279pb de su cDNA sirvió como patrón interno de amplificación en la RT-PCR semicuantitativa.

Por tanto, de manera similar a lo observado con las células SH-SY5Y, el RA induce la disminución en la expresión de Rae1, lo que parece ser necesario para que tenga lugar la degradación de Skp2 por APC/C-Cdh1 y la subsecuente acumulación de p27.

2.2 Tratamiento con RA en las líneas celulares de neuroblastoma humano, IMR-32 y SK-N-BE(2)

La agresividad de los neuroblastomas se ha asociado con la amplificación de *NMYC* (Schwab *et al.*, 1984; Seeger *et al.*, 1985) y la ausencia de diferenciación neuronal (Shimada *et al.*, 1984). De hecho, un estudio reciente ha puesto de manifiesto que los neuroblastomas con mal pronóstico, incluidos los casos con amplificación de *NMYC*, presentan un incremento en la señalización activada por *MYC* (entendiéndose como tal la activación de la transcripción de los genes diana de *Myc*, *N-Myc* y *L-Myc*) y baja expresión de los genes marcadores de diferenciación neuronal (Fredlund *et al.*, 2008).

Debido a que los resultados expuestos anteriormente en esta Memoria sugieren que *Rae1* podría tener un papel en el proceso de diferenciación neuronal como regulador de la actividad de *APC/C-Cdh1*, decidimos investigar los cambios de la expresión proteica en las líneas de neuroblastoma IMR-32 (Tumilowicz *et al.*, 1970) y SK-N-BE(2) (Barnes *et al.*, 1981) en respuesta a RA. En ambas líneas celulares se ha observado amplificación de *NMYC*, con presencia de DMs ("Double minutes") y HSR ("homogeneously staining region") respectivamente (Thiele 1998).

Las células IMR-32 están constituidas por dos tipos celulares distintos, siendo el neuroblástico (N), el mayoritario. Este tipo celular es pequeño, altamente refractario a la luz, con forma fibroblástica ó de lágrima, que a menudo crece formando acúmulos. El tratamiento con RA induce un proceso de diferenciación evidente a nivel ultraestructural en la organización de los orgánulos en el interior de la célula, similar al observado en el tejido neural (Tumilowicz *et al.*, 1970). Sin embargo, las células no desarrollan neuritas, sino que el tratamiento con RA provoca el alargamiento de su cuerpo celular (Sidell *et al.*, 1983).

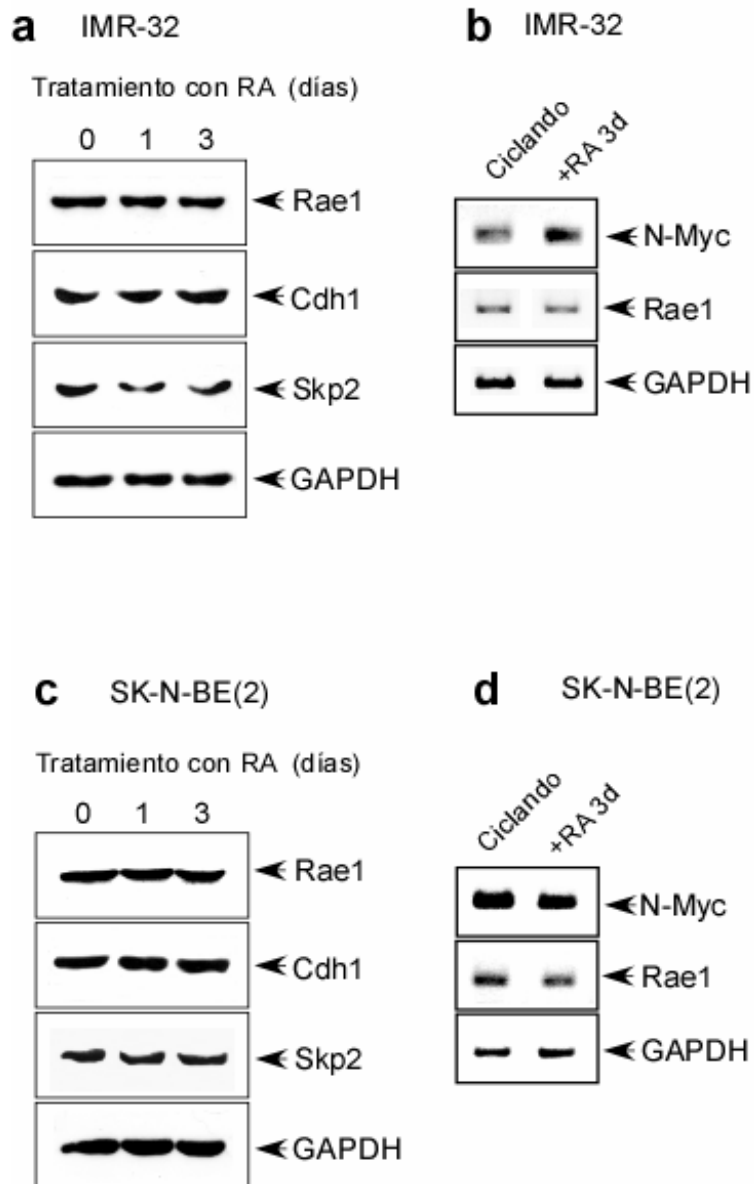


Figura 17. El RA no disminuye la expresión de Rae1 en las líneas celulares IMR-32 y SK-N-BE(2). (a) y (c) En las células IMR-32 y SK-N-BE(2) no se produjo la disminución de los niveles proteicos de Rae1 y Skp2 a los 3 días de tratamiento con RA. (b) y (d) Los niveles de mRNA de Rae1, analizados mediante RT-PCR semicuantitativa, no disminuyeron en respuesta al tratamiento con RA durante 3 días. La proteína GAPDH se empleó como control de carga de proteínas, y la amplificación de un fragmento de 279pb de su cDNA sirvió como patrón interno de amplificación en la RT-PCR semicuantitativa.

En la línea celular SK-N-BE(2) se distinguen dos poblaciones celulares, células neuroblásticas (N), que presentan largas prolongaciones celulares, y células con morfología epitelioide (S). Tampoco en esta línea celular se desencadena un proceso

de diferenciación neuronal en respuesta a RA, ya que las prolongaciones celulares que aparecen no poseen la estructura de los axones ni en desarrollo ni maduros observados *in vivo* (Barnes *et al.*, 1981).

Así, nuestros resultados mostraron que la expresión de la proteína Rae1, al igual que Cdh1, permaneció invariable durante los tres días de tratamiento con RA en ambas líneas celulares,. Por otro lado, la proteína Skp2, principal sustrato de APC/C-Cdh1 durante la fase G1, era detectable tras tres días de incubación con el derivado retinoide (Fig. 17a y 17c).

Adicionalmente, el RA no fue capaz de alterar los niveles de mRNA de Rae1 en las células que amplifican *NMYC* (Fig. 17b y 17d), en contra de lo observado en las células SH-SY5Y (Fig. 11b) y SK-N-SH (Fig. 16c), que no amplifican el oncogén.

Estos resultados concuerdan con los expuestos anteriormente en esta Memoria y confirman que Rae1, a través de la modulación de la actividad de APC/C-Cdh1, regula la degradación de Skp2 causada por el tratamiento con el RA.

2.3 Efecto de la disminución de los niveles de Rae1 en las líneas celulares IMR-32 y SK-N-BE(2)

Nuestro siguiente objetivo fue corroborar la función de Rae1 sobre el ciclo celular y la diferenciación causada por RA en células de neuroblastoma humano. Para ello, las células SK-N-BE(2) e IMR-32 se transfectaron con el siRNA específico contra Rae1 (Blower *et al.*, 2005) y se incubaron en presencia de RA durante tres días. Como se muestra en la Fig. 18, el silenciamiento de Rae1 provocó un incremento tanto en los niveles de p27 (Fig. 18 a y 18 c) como en el porcentaje de células en fase G0/G1 (Fig.

18b y 18d) en las células tratadas con RA. Por tanto, la ausencia de Rae1 previno la resistencia de ambos tipos de células al tratamiento con RA.

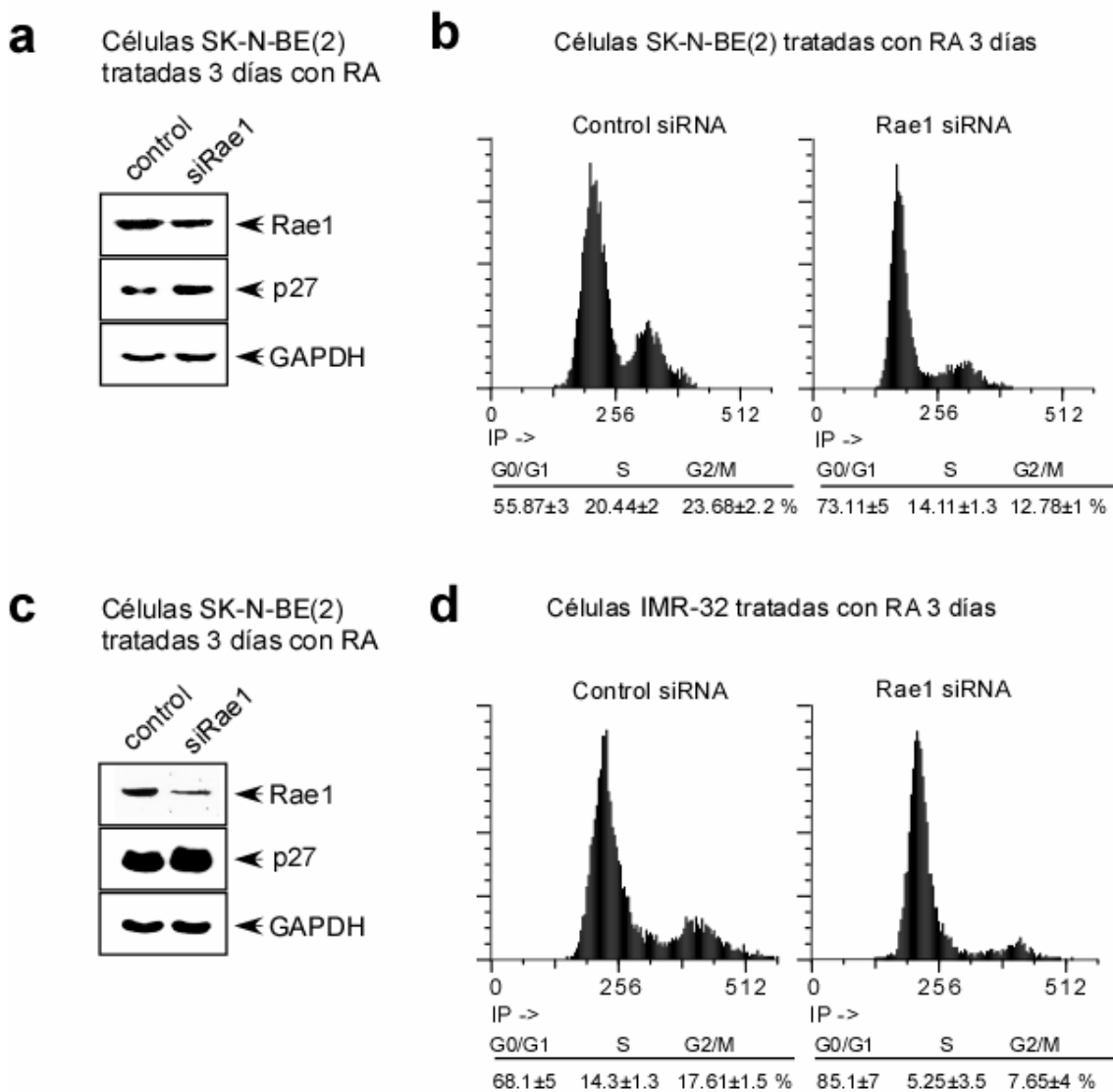


Figura 18. El silenciamiento de Rae1 incrementa los niveles de p27 y la parada en fase G0/G1 de las células IMR-32 y SK-N-BE(2), en respuesta al tratamiento con RA. (a) y (c) Las células IMR-32 y SK-N-BE(2) ciclando se transfectaron con el siRNA específico contra Rae1. La posterior incubación con RA durante 3 días indujo el aumento de los niveles proteicos de p27. (c) y (d) El silenciamiento de Rae1 (Rae1 siRNA) indujo un aumento en el porcentaje de células en fase G0/G1 en respuesta a la incubación con RA durante 3 días.

Estos resultados sugieren que la presencia de Rae1 actúa regulando la acumulación de p27 inducida por RA en las líneas de neuroblastoma que amplifican *MYC*, al igual que observamos en las células SH-SY5Y y SK-N-SH. Es más, en las células IMR-32 transfectadas con el siRNA contra Rae1 e incubadas con RA se observaron cambios morfológicos compatibles con el desarrollo de un fenotipo similar al neuronal, como es el aumento de la extensión de neuritas (Fig. 19a y 19b).

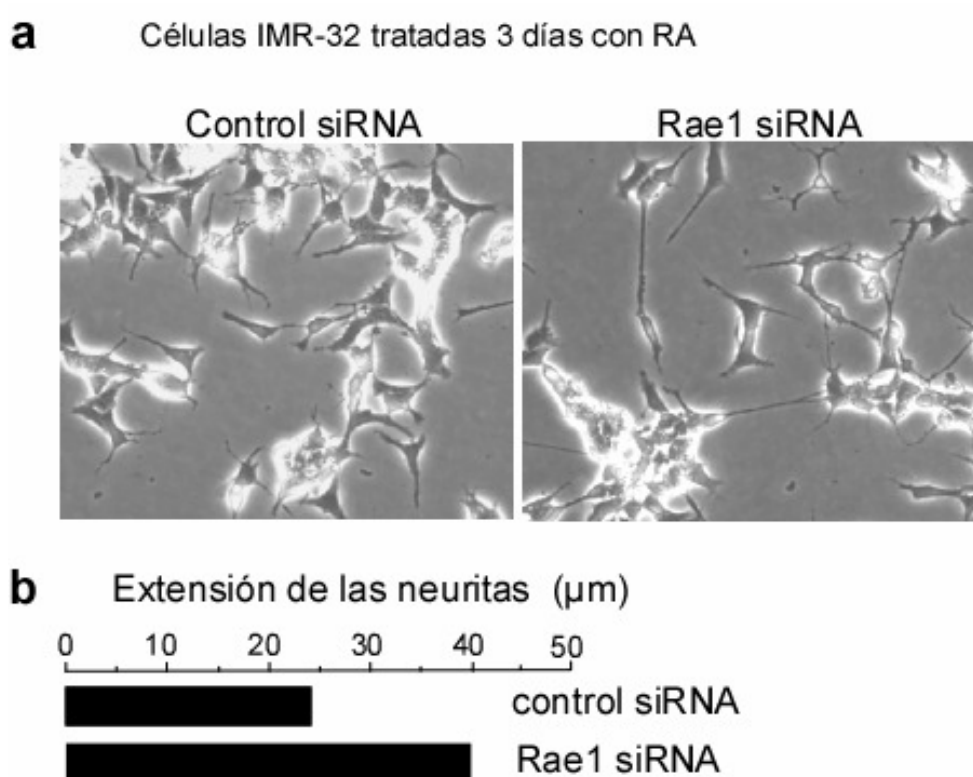


Figura 19. Cambios morfológicos inducidos por RA en células IMR-32 transfectadas con el siRNA contra Rae1. (a) Las imágenes de microscopía en contraste de fases mostraron cambios morfológicos similares al fenotipo neuronal, en las células IMR-32 transfectadas con el siRNA específico contra Rae1 e incubadas 3 días con RA. (b) Cuantificación del incremento en la extensión de posibles procesos neuríticos observados en la imágenes de microscopía.

Por tanto, la expresión de Rae1, cuya disminución es refractaria al tratamiento con RA en las células SK-N-BE(2) e IMR-32, podría afectar al proceso de acumulación

de p27, desencadenado por la actividad E3 ubiquitina ligasa de APC/C-Cdh1, que es necesaria para el comienzo de la diferenciación neuronal.

2.4 Efecto de N-Myc sobre la expresión de Rae1

La familia de oncogenes *MYC*, a la que pertenece *MYC*, codifica factores de transcripción que incrementan la expresión de multitud de genes (Blackwood and Eisenman 1991). Entre los distintos procesos en los que participan, actúan sobre el ciclo celular, alterando la expresión de diversos genes que desencadena el incremento de la proliferación celular (Knoepfler *et al.*, 2002). Aunque se postula que cada uno de los miembros de esta familia de oncogenes posee una función determinada, los estudios realizados hasta ahora no han aportado mucha información a este respecto. En concreto, en el caso de N-Myc existen pocos datos referentes a sus efectos en la progresión del ciclo celular. Los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo*, apuntan a que N-myc es capaz de reemplazar la actividad de c-myc (Malynn *et al.*, 2000).

Un estudio reciente ha demostrado que c-myc activa la transcripción de los genes *MAD2* y *BubR1* (Menssen *et al.*, 2007), que codifican dos proteínas del SAC implicadas en la inhibición de APC/C durante prometafase (Sudakin *et al.*, 2001). Este efecto se produce a través de la unión de c-myc a las cajas E, presentes en el primer intrón de ambos genes. Teniendo en cuenta que Rae1 es un regulador de la actividad de APC/C como parte del SAC, junto con Nup-98 (Jeganathan *et al.*, 2005), y dado que en las líneas celulares con amplificación de *MYC* los niveles de Rae1 permanecieron constantes durante el tratamiento con RA, nuestro siguiente objetivo fue investigar el posible efecto de N-myc sobre la expresión de Rae1.

Para ello, células SH-SY5Y ciclando se transfectaron con el vector pUHD10(XhoI)-NMYC, que contiene la secuencia que codifica el factor de transcripción N-Myc (Stanton *et al.*, 1986). Como se muestra en la Fig. 19b, la sobreexpresión de N-Myc no alteró los niveles de expresión de Rae1 en las células SH-SY5Y, lo que parece descartar un efecto directo del oncogen. Dado que el tratamiento con RA provocó la rápida degradación de N-Myc, como se ha descrito por otros autores (Matsuo and Thiele 1998; Strieder and Lutz 2002; Schwab 2004), no se pudo evaluar el efecto de la sobreexpresión de N-Myc sobre los niveles de Rae1 en presencia de RA (Fig. 19b).

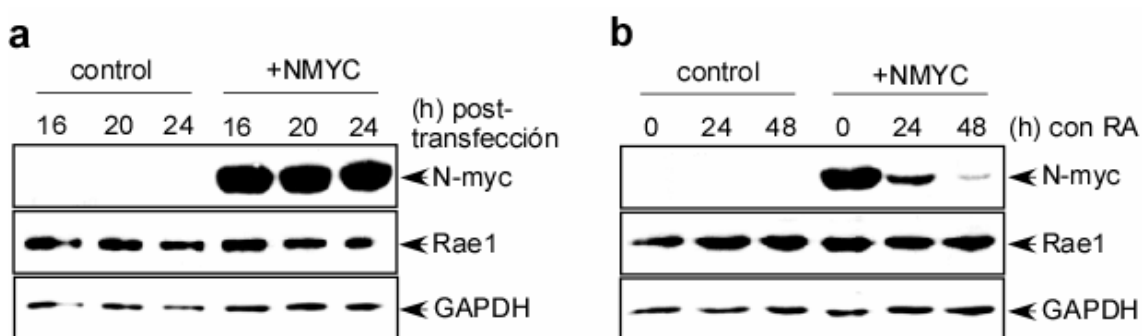


Figura 20. El RA induce el descenso drástico de la proteína N-myc en las células SH-SY5Y en las que se indujo el incremento de su expresión. (a) El mRNA de N-myc, analizado mediante RT-PCR semicuantitativa, es indetectable en las células SH-SY5Y tanto antes como después de la incubación con RA (b) Las células SH-SY5Y transfectadas con el vector pUHD10(XhoI)-N-Myc (+NMYC) mostraron un gran incremento de los niveles proteicos de N-myc, mientras que la expresión proteica de Rae1 se mantuvo inalterada. (c) En estas células SH-SY5Y, los niveles de N-myc descendieron drásticamente tras la incubación con RA durante 48 horas.

Aunque nuestros resultados (Fig. 19) parecían descartar a N-Myc como activador de la transcripción de *RAE1* durante la diferenciación neuronal inducida por el RA, el análisis de la secuencia de su promotor reveló la existencia de dos cajas E, canónica y no canónica (Fernandez *et al.*, 2003; Zeller *et al.*, 2003). Una de ellas, al

estar próxima al sitio de comienzo de la transcripción (TSS) (Fig. 21a), podría ser una firme candidata a unirse a N-Myc.

Sin embargo, el análisis de Inmunoprecipitación de cromatina (Chip) descartó la existencia de una interacción de N-Myc con el promotor de *RAE1* en las células SK-N-BE(2) ciclando (Fig. 21b). Como control positivo del análisis se utilizó el promotor del gen *protimosina-α* (*PTMA*) y como control negativo, la amplificación de una secuencia de DNA del intrón 5 del gen *RAE1*.

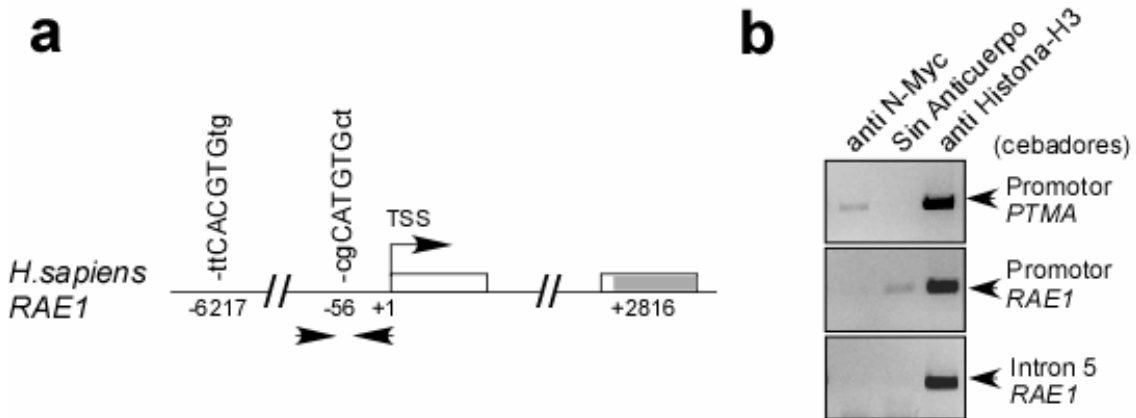


Figura 21. N-Myc no interacciona con la caja E presente en el TSS del gen *RAE1*. (a) Posición de las cajas E presentes en el promotor del gen *RAE1*, en relación al sitio de comienzo de la transcripción (TSS). Los exones están representados por rectángulos. Las secuencias que codifican la proteína están sombreadas en gris. Las puntas de flecha representan la posición de los oligonucleótidos usados para el análisis de Chip. (b) Las células SK-N-BE(2) ciclando se emplearon para el análisis de Chip. Mediante PCR se analizaron los fragmentos de DNA a los que se une N-Myc, y sólo en el caso de la pareja de oligonucleótidos que flanquean la caja E del gen *protimosina-α* (*PTMA*), control positivo, se produjo amplificación.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

1. El RA induce la diferenciación de la línea de neuroblastoma humano a través de la progresiva acumulación de p27 debida a la desestabilización de Skp2

Está bien establecido que el RA induce la diferenciación neuronal de algunos neuroblastomas humanos (Reynolds *et al.*, 2003). En el caso de la línea de neuroblastoma SH-SY5Y, la exposición a este derivado retionide durante 5 días desencadena cambios fenotípicos compatibles con la diferenciación neuronal, así como la disminución de la tasa de proliferación (Encinas *et al.*, 2000; Almeida *et al.*, 2005). Actualmente, se sabe que el RA actúa deteniendo la progresión del ciclo celular ejerciendo su regulación en la fase G1, a través del aumento los niveles del CKI, p27, (Nakamura *et al.*, 2003; Borriello *et al.*, 2006) como consecuencia de una disminución en su degradación regulada por el activador de la E3 ubiquitina ligasa, Skp2 (Carrano *et al.*, 1999; Sutterluty *et al.*, 1999; Bloom and Pagano 2003). Así el RA actúa incrementando la degradación de Skp2, lo que resulta en la estabilización de p27, como se ha observado previamente en varias líneas celulares tumorales (Nakamura *et al.*, 2003; Zancai *et al.*, 2005). En nuestras condiciones experimentales pudimos constatar los cambios morfológicos inducidos en las células SH-SY5Y en respuesta al tratamiento con RA, se acompañaban no sólo de un incremento de la expresión de diversos marcadores neuronales, como Map2, Gap43 y Tau, si no que además se producía una paulatina acumulación de p27 en el núcleo paralela a la disminución de la expresión nuclear de Skp2.

La degradación de Skp2 es necesaria no sólo en la parada de las células en fase G1 sino también en la diferenciación neuronal inducida por RA, como pudimos constatar a través de la sobreexpresión de una forma mutada de Skp2, no degradable.

En nuestro modelo de diferenciación neuronal *in vitro*, el mRNA de Skp2 es detectable hasta el quinto día de incubación con RA, a diferencia de lo que sucede con su expresión proteica, lo que apoya la existencia de un mecanismo de regulación post-transcripcional. Se ha descrito que los niveles proteicos de Skp2 están regulados a través de la degradación proteosómica mediada por la actividad de APC/C-Cdh1 (Bashir *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2004). Así, observamos que el tratamiento con RA, induce la progresiva acumulación nuclear del activador de APC/C, Cdh1, mientras desaparece del citosol, lo que concuerda con otros trabajos en los que se ha descrito la presencia de Cdh1, pero no de Cdc20, en neuronas post-mitóticas (Gieffers *et al.*, 1999; Almeida *et al.*, 2005). Y además sugiere que su acumulación nuclear podría ser la responsable de la disminución de Skp2 en el núcleo.

2. APC/C-Cdh1 participa en la parada en fase G0/G1 y en la diferenciación neuronal inducida por RA

La presencia de Cdh1, como activador de APC/C, en neuronas post-mitóticas, se ha relacionado ya con distintos procesos como el crecimiento axonal (Konishi *et al.*, 2004), la supervivencia neuronal (Almeida *et al.*, 2005), la función sináptica (Cline 2003) y la capacidad glucolítica neuronal (Herrero-Mendez *et al.*, 2009). En este Trabajo, demostramos que la actividad de APC/C-Cdh1 media el efecto antiproliferativo del RA. Puesto que la inhibición de la actividad de APC/C-Cdh1 bien mediante el silenciamiento de Cdh1 mediante RNA de interferencia, o bien a través de la sobreexpresión del conocido inhibidor de APC/C, hEmi1 (Reimann *et al.*, 2001b; Hsu *et al.*, 2002), da lugar a un incremento de la población en fase S tanto en células

ciclando como en células tratadas con RA. En ambas situaciones, además, se aprecia un aumento en la expresión de Skp2, con la consecuente disminución de p27. Lo que sugiere que la degradación de Skp2 mediada por APC/C-Cdh1 es un requisito necesario para la parada de las células en fase G1. Por otro lado, la acumulación de p27 es necesaria para la diferenciación de las líneas de neuroblastoma *in vitro* (Borriello *et al.*, 2000; Borriello *et al.*, 2006), y durante el desarrollo la corteza cerebral, está relacionada con la coordinación de la salida del ciclo celular, la diferenciación neuronal y la migración radial (Nguyen *et al.*, 2006). Lo que explicaría el hecho de que tanto la sobreexpresión de una forma mutada de Skp2, refractaria a la degradación por APC/C-Cdh1 y el silenciamiento de Cdh1 desencadenen no sólo un descenso de los niveles proteicos de p27, sino también de la expresión de Map2. Relacionando la actividad de APC/C-Ch1 con la neurogénesis, inducida por RA.

Por otra parte, en esta Memoria, se aportan datos que sugieren que la actividad de APC-Cdh1 no sólo podría estar implicada en la regulación de la degradación de Skp2 y la estabilización de p27 durante la diferenciación neuronal de la línea de neuroblastoma SH-SY5Y inducida por RA, si no que también con la diferenciación de neuronas corticales en cultivo primario.

Las funciones neuronales de Cdh1 *in vivo* han sido analizadas en el *knockout* condicional generado recientemente. El ratón heterocigoto para Cdh1 (*Fzr+/-*) no ha mostrado alteraciones en la estructura del sistema nervioso, sin embargo, se ha identificado una población celular específica en la zona subventricular, rica en células stem neuronales, que es particularmente susceptible a la reducción de los niveles de Cdh1 y muestra un incremento en la tasa de proliferación (Garcia-Higuera *et al.*, 2008).

3. La disminución de Rae1 mediada por ácido trans-retinoico desencadena la activación de APC/C-Cdh1

El reciente descubrimiento de la inhibición de la actividad del complejo APC/C-Cdh1 durante la prometafase a cargo del complejo de los factores nucleocitoplásmicos, Rae1 y Nup98 (Jeganathan *et al.*, 2005), nos llevó al estudio de la modulación de la expresión de ambas proteínas durante el proceso de diferenciación inducido por RA. Dado que sólo la expresión de Rae1 se ve disminuida en respuesta a la incubación con el derivado retinoide, quisimos observar las consecuencias de su sobreexpresión y silenciamiento en la actividad de APC/C-Cdh1. Los efectos del aumento de los niveles proteicos de Rae1, mediante su sobreexpresión, mimetizan los obtenidos en la inhibición de la actividad de APC/C-Cdh1 tanto por silenciamiento de Cdh1 como por sobreexpresión de hEmi1. Mientras que el silenciamiento de Rae1 conlleva una aceleración del proceso de diferenciación neuronal inducido por RA en las células SH-SY5Y. Además las células de neuroblastoma humano, SK-N-SH, que también desarrollan un fenotipo compatible con la diferenciación neuronal en respuesta a RA (Ross *et al.*, 1983; Edsjo *et al.*, 2004), muestran una disminución de Rae1 a lo largo del tratamiento. Los niveles de Cdh1 permanecen constantes, aunque la actividad de APC/C-Cdh1, traducida en el aumento de la degradación de Skp2, sólo es notable cuando desciende Rae1 al tercer día de tratamiento con RA de esta línea de neuroblastoma humano.

Por otro lado, también hemos constatado que la disminución de la expresión proteica de Rae1 tiene lugar en la diferenciación de neuronas corticales en cultivo primario. Por tanto, el descenso de Rae1, necesario para la activación de APC/C-Cdh1, podría ser un requisito imprescindible durante la diferenciación neuronal.

Aunque, no hay que olvidar que la actividad de APC/C-Cdh1 durante la fase G1 es regulada por otros mecanismos, entre los que se incluye la desfosforilación de Cdh1 a cargo de hCdc14 al comienzo de la fase G1 (Bembenek and Yu 2001), o interacción con pRb, descrita recientemente, que estimularía la degradación de Skp2 (Binne *et al.*, 2007) y participaría en el proceso de diferenciación.

Desafortunadamente, la disminución de Rae1 en el desarrollo del cerebro *in vivo*, no ha sido estudiada en los ratones doble haploinsuficientes para Rae1 y Nup98 (*RAE1+/-NUP98+/-*). En los cuales la disminución simultánea de Rae1 y Nup98 está relacionada con el desarrollo de tumores (Jeganathan *et al.*, 2006).

4. Rae1 en las líneas de neuroblastoma con amplificación de NMYC

Un estudio reciente ha puesto de manifiesto que los neuroblastomas con mal pronóstico, incluidos los casos con amplificación de *NMYC*, presentan un incremento de la señalización activada por MYC (entendiéndose como tal la activación de la transcripción de los genes diana de Myc, N-Myc y L-Myc) y baja expresión de los genes marcadores de diferenciación neuronal (Fredlund *et al.*, 2008). Adicionalmente, los datos clínicos han mostrado que algunos neuroblastomas son resistentes o desarrollan resistencia al tratamiento con ácido 13-*cis*-retinoico (Matthay *et al.*, 1999), derivado retinoide con idéntico mecanismo de acción que el ácido *trans*-retinoico, aunque con mejores propiedades farmacocinéticas (Reynolds *et al.*, 2003).

Dado que nuestros resultados apuntan a la participación de Rae1 en el proceso de diferenciación neuronal, nos planteamos la posibilidad de que su expresión proteica pudiera estar alterada en las líneas celulares de neuroblastoma con amplificación de *NMYC* en respuesta a RA. Por ello, estudiamos los cambios en la expresión de Rae1

en las células IMR-32 y SK-N-BE(2). Ambas líneas celulares presentan amplificación de *MYC*. Aunque, en ninguna de las dos líneas celulares, se ha descrito el desarrollo de un fenotipo neuronal en respuesta a RA (Tumilowicz *et al.*, 1970; Barnes *et al.*, 1981; Sidell *et al.*, 1983)

Dado que tanto en las células SH-SY5Y como en las SK-N-SH, la disminución de los niveles proteicos de Rae1 es detectable a los 3 días de tratamiento con RA, analizamos los niveles proteicos de Rae1 en las células IMR-32 y SK-N-BE(2) durante ese tiempo de incubación. En las líneas de neuroblastoma con amplificación de *MYC*, no pudimos observar la disminución de los niveles proteicos de Rae1, ni tampoco el descenso de la expresión de Skp2, principal sustrato de APC/C-Cdh1 durante la fase G1, que se produce en las líneas celulares de neuroblastoma sin amplificación de *MYC* (SH-SY5Y y SK-N-SH). El silenciamiento de Rae1 en las células IMR-32 y SK-N-BE(2) desencadena los mismos efectos en la proliferación del ciclo celular que en las células SH-SY5Y, tras la exposición a RA. E incluso en las células IMR-32 se aprecia un incremento de la extensión de neuritas.

Recientemente se ha descrito que c-Myc modula la expresión de los genes *MAD2* y *BubR1*, que codifican para proteínas del SAC implicadas en el control de la actividad de APC/C durante la prometafase (Menssen *et al.*, 2007). Actualmente, no están claramente delimitadas las funciones de c-Myc y N-Myc. Y lo que es más, N-Myc puede reemplazar a c-Myc, según estudios realizados *in vivo* e *in vitro* (Malynn *et al.*, 2000). En base a estos antecedentes, nos planteamos la posibilidad de que N-Myc pudiera regular la actividad de APC/C-Cdh1, incrementando la transcripción de *RAE1*. Para analizar esta hipótesis, sobreexpresamos N-Myc en las células SH-SY5Y. Sin embargo, el análisis a distintos tiempos de sobreexpresión no reveló ningún

incremento en la expresión de Rae1. La posterior incubación de las células transfectadas con RA tampoco nos permitió analizar posibles alteraciones en los niveles proteicos de Rae1, tras tres días de incubación con el derivado retionide. Ya que, pudimos comprobar que el RA incrementa drásticamente el proceso de degradación de N-Myc, como se ha observado en otros estudios (Matsuo and Thiele 1998; Strieder and Lutz 2002; Schwab 2004), antes de alcanzar el tercer día de incubación. En el promotor del gen *RAE1* hemos identificado varias secuencias de unión de las proteínas de la familia Myc, denominadas cajas E. Por lo que para identificar la interacción de N-Myc con una de las cajas E presentes en el promotor del gen *RAE1*, próximo al sitio de comienzo de la transcripción (TSS) realizamos una inmunoprecipitación de cromatina (Chip). Aunque los resultados apuntan que la modificación de la transcripción de *RAE1*, a través N-Myc, debe de producirse a través de un mecanismo indirecto.

BIBLIOGRAFÍA

Adhikary S. and Eilers M. (2005) Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 635-645.

Alexander K. and Hinds P. W. (2001) Requirement for p27(KIP1) in retinoblastoma protein-mediated senescence. *Molecular and cellular biology* **21**, 3616-3631.

Almeida A., Bolanos J. P. and Moreno S. (2005) Cdh1/Hct1-APC is essential for the survival of postmitotic neurons. *J Neurosci* **25**, 8115-8121.

Amler L. C., Schurmann J. and Schwab M. (1996) The DDX1 gene maps within 400 kbp 5' to MYCN and is frequently coamplified in human neuroblastoma. *Genes, chromosomes & cancer* **15**, 134-137.

Appel B. and Eisen J. S. (2003) Retinoids run rampant: multiple roles during spinal cord and motor neuron development. *Neuron* **40**, 461-464.

Babu J. R., Jeganathan K. B., Baker D. J., Wu X., Kang-Decker N. and van Deursen J. M. (2003) Rael is an essential mitotic checkpoint regulator that cooperates with Bub3 to prevent chromosome missegregation. *The Journal of cell biology* **160**, 341-353.

Baker D. J., Dawlaty M. M., Galaray P. and van Deursen J. M. (2007) Mitotic regulation of the anaphase-promoting complex. *Cell Mol Life Sci* **64**, 589-600.

Baker D. J., Jeganathan K. B., Malureanu L., Perez-Terzic C., Terzic A. and van Deursen J. M. (2006) Early aging-associated phenotypes in Bub3/Rael haploinsufficient mice. *The Journal of cell biology* **172**, 529-540.

Baker D. J., Jeganathan K. B., Cameron J. D., Thompson M., Juneja S., Kopecka A., Kumar R., Jenkins R. B., de Groen P. C., Roche P. and van Deursen J. M. (2004) BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. *Nature genetics* **36**, 744-749.

Baldassarre G., Boccia A., Bruni P., Sandomenico C., Barone M. V., Pepe S., Angrisano T., Belletti B., Motti M. L., Fusco A. and Viglietto G. (2000) Retinoic acid induces neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells by reducing proteasome-dependent proteolysis of the cyclin-dependent inhibitor p27. *Cell Growth Differ* **11**, 517-526.

Balmer J. E. and Blomhoff R. (2002) Gene expression regulation by retinoic acid. *Journal of lipid research* **43**, 1773-1808.

Barnes E. N., Biedler J. L., Spengler B. A. and Lyser K. M. (1981) The fine structure of continuous human neuroblastoma lines SK-N-SH, SK-N-BE(2), and SK-N-MC. *In vitro* **17**, 619-631.

Bashir T., Dorrello N. V., Amador V., Guardavaccaro D. and Pagano M. (2004) Control of the SCF(Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C(Cdh1) ubiquitin ligase. *Nature* **428**, 190-193.

Bastien J. and Rochette-Egly C. (2004) Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* **328**, 1-16.

Bayani J., Zielenska M., Marrano P., Kwan Ng Y., Taylor M. D., Jay V., Rutka J. T. and Squire J. A. (2000) Molecular cytogenetic analysis of medulloblastomas and supratentorial primitive neuroectodermal tumors by using conventional banding, comparative genomic hybridization, and spectral karyotyping. *J Neurosurg* **93**, 437-448.

Bell E., Lunec J. and Tweddle D. A. (2007) Cell cycle regulation targets of MYCN identified by gene expression microarrays. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **6**, 1249-1256.

Bell E., Premkumar R., Carr J., Lu X., Lovat P. E., Kees U. R., Lunec J. and Tweddle D. A. (2006) The role of MYCN in the failure of MYCN amplified neuroblastoma cell lines to G1 arrest after DNA damage. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **5**, 2639-2647.

Bembenek J. and Yu H. (2001) Regulation of the anaphase-promoting complex by the dual specificity phosphatase human Cdc14a. *The Journal of biological chemistry* **276**, 48237-48242.

- Biedler J. L., Helson L. and Spengler B. A. (1973) Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer research* **33**, 2643-2652.
- Binne U. K., Classon M. K., Dick F. A., Wei W., Rape M., Kaelin W. G., Jr., Naar A. M. and Dyson N. J. (2007) Retinoblastoma protein and anaphase-promoting complex physically interact and functionally cooperate during cell-cycle exit. *Nature cell biology* **9**, 225-232.
- Birnboim H. C. and Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* **7**, 1513-1523.
- Blackwood E. M. and Eisenman R. N. (1991) Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science (New York, N.Y)* **251**, 1211-1217.
- Blomhoff R. and Blomhoff H. K. (2006) Overview of retinoid metabolism and function. *Journal of neurobiology* **66**, 606-630.
- Bloom J. and Pagano M. (2003) Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. *Seminars in cancer biology* **13**, 41-47.
- Blower M. D., Nachury M., Heald R. and Weis K. (2005) A Rael-containing ribonucleoprotein complex is required for mitotic spindle assembly. *Cell* **121**, 223-234.
- Borriello A., Pietra V. D., Criscuolo M., Oliva A., Tonini G. P., Iolascon A., Zappia V. and Ragione F. D. (2000) p27Kip1 accumulation is associated with retinoic-induced neuroblastoma differentiation: evidence of a decreased proteasome-dependent degradation. *Oncogene* **19**, 51-60.
- Borriello A., Cucciolla V., Criscuolo M., Indaco S., Oliva A., Giovane A., Bencivenga D., Iolascon A., Zappia V. and Della Ragione F. (2006) Retinoic acid induces p27Kip1 nuclear accumulation by modulating its phosphorylation. *Cancer research* **66**, 4240-4248.
- Brewer, 567Almeida, A. and Medina J. M. (1998) A rapid method for the isolation of metabolically active mitochondria from rat neurons and astrocytes in primary culture. *Brain research* **2**, 209-214.
- Brewer G. J. (1995) Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus. *Journal of neuroscience research* **42**, 674-683.
- Brodeur G. M. (2003) Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nature reviews* **3**, 203-216.
- Brodeur G. M., Pritchard J., Berthold F., Carlsen N. L., Castel V., Castelberry R. P., De Bernardi B., Evans A. E., Favrot M., Hedborg F. and et al. (1993) Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* **11**, 1466-1477.
- Bronner-Fraser M. (1994) Neural crest cell formation and migration in the developing embryo. *Faseb J* **8**, 699-706.
- Budhu A. S. and Noy N. (2002) Direct channeling of retinoic acid between cellular retinoic acid-binding protein II and retinoic acid receptor sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid-induced growth arrest. *Molecular and cellular biology* **22**, 2632-2641.
- Burds A. A., Lutum A. S. and Sorger P. K. (2005) Generating chromosome instability through the simultaneous deletion of Mad2 and p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 11296-11301.
- Burke D. J. (2000) Complexity in the spindle checkpoint. *Current opinion in genetics & development* **10**, 26-31.

- Cardozo T. and Pagano M. (2004) The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 739-751.
- Carrano A. C., Eytan E., Hershko A. and Pagano M. (1999) SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nature cell biology* **1**, 193-199.
- Castel V., Grau E., Noguera R. and Martinez F. (2007) Molecular biology of neuroblastoma. *Clin Transl Oncol* **9**, 478-483.
- Castro A., Vigneron S., Bernis C., Labbe J. C. and Lorca T. (2003) Xkid is degraded in a D-box, KEN-box, and A-box-independent pathway. *Molecular and cellular biology* **23**, 4126-4138.
- Castro A., Bernis C., Vigneron S., Labbe J. C. and Lorca T. (2005) The anaphase-promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle. *Oncogene* **24**, 314-325.
- Castro A., Arlot-Bonnemains Y., Vigneron S., Labbe J. C., Prigent C. and Lorca T. (2002) APC/Fizzy-Related targets Aurora-A kinase for proteolysis. *EMBO reports* **3**, 457-462.
- Cline H. (2003) Synaptic plasticity: importance of proteasome-mediated protein turnover. *Curr Biol* **13**, R514-516.
- Collins V. P. (1993) Amplified genes in human gliomas. *Semin Cancer Biol* **4**, 27-32.
- Corvi R., Amler L. C., Savelyeva L., Gehring M. and Schwab M. (1994) MYCN is retained in single copy at chromosome 2 band p23-24 during amplification in human neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 5523-5527.
- Cowling V. H. and Cole M. D. (2007) The Myc transactivation domain promotes global phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain independently of direct DNA binding. *Molecular and cellular biology* **27**, 2059-2073.
- Charron J., Malynn B. A., Fisher P., Stewart V., Jeannotte L., Goff S. P., Robertson E. J. and Alt F. W. (1992) Embryonic lethality in mice homozygous for a targeted disruption of the N-myc gene. *Genes & development* **6**, 2248-2257.
- Cheng S. W., Davies K. P., Yung E., Beltran R. J., Yu J. and Kalpana G. V. (1999) c-MYC interacts with INI1/hSNF5 and requires the SWI/SNF complex for transactivation function. *Nature genetics* **22**, 102-105.
- Cheung N. K., Kushner B. H., Yeh S. D. and Larson S. M. (1998) 3F8 monoclonal antibody treatment of patients with stage 4 neuroblastoma: a phase II study. *International journal of oncology* **12**, 1299-1306.
- Chiarle R., Fan Y., Piva R., Boggino H., Skolnik J., Novero D., Palestro G., De Wolf-Peeters C., Chilosì M., Pagano M. and Inghirami G. (2002) S-phase kinase-associated protein 2 expression in non-Hodgkin's lymphoma inversely correlates with p27 expression and defines cells in S phase. *The American journal of pathology* **160**, 1457-1466.
- Chiarle R., Budel L. M., Skolnik J., Frizzera G., Chilosì M., Corato A., Pizzolo G., Magidson J., Montagnoli A., Pagano M., Maes B., De Wolf-Peeters C. and Inghirami G. (2000) Increased proteasome degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is associated with a decreased overall survival in mantle cell lymphoma. *Blood* **95**, 619-626.
- Chung E. and Chen R. H. (2003) Phosphorylation of Cdc20 is required for its inhibition by the spindle checkpoint. *Nature cell biology* **5**, 748-753.
- Davis A. C., Wims M., Spotts G. D., Hann S. R. and Bradley A. (1993) A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes & development* **7**, 671-682.

- Diez del Corral R. and Storey K. G. (2004) Opposing FGF and retinoid pathways: a signalling switch that controls differentiation and patterning onset in the extending vertebrate body axis. *Bioessays* **26**, 857-869.
- Dinsmore J. H. and Solomon F. (1991) Inhibition of MAP2 expression affects both morphological and cell division phenotypes of neuronal differentiation. *Cell* **64**, 817-826.
- Dobles M., Liberal V., Scott M. L., Benezra R. and Sorger P. K. (2000) Chromosome missegregation and apoptosis in mice lacking the mitotic checkpoint protein Mad2. *Cell* **101**, 635-645.
- Eberhardy S. R. and Farnham P. J. (2001) c-Myc mediates activation of the cad promoter via a post-RNA polymerase II recruitment mechanism. *The Journal of biological chemistry* **276**, 48562-48571.
- Edsjo A., Nilsson H., Vandesompele J., Karlsson J., Pattyn F., Culp L. A., Speleman F. and Pahlman S. (2004) Neuroblastoma cells with overexpressed MYCN retain their capacity to undergo neuronal differentiation. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **84**, 406-417.
- Edwards M. K. and McBurney M. W. (1983) The concentration of retinoic acid determines the differentiated cell types formed by a teratocarcinoma cell line. *Developmental biology* **98**, 187-191.
- Encinas M., Iglesias M., Liu Y., Wang H., Muhaisen A., Cena V., Gallego C. and Comella J. X. (2000) Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *Journal of neurochemistry* **75**, 991-1003.
- Esposito V., Baldi A., De Luca A., Groger A. M., Loda M., Giordano G. G., Caputi M., Baldi F., Pagano M. and Giordano A. (1997) Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer. *Cancer research* **57**, 3381-3385.
- Evans A. E., Kisselbach K. D., Yamashiro D. J., Ikegaki N., Camoratto A. M., Dionne C. A. and Brodeur G. M. (1999) Antitumor activity of CEP-751 (KT-6587) on human neuroblastoma and medulloblastoma xenografts. *Clin Cancer Res* **5**, 3594-3602.
- Evans T., Rosenthal E. T., Youngblom J., Distel D. and Hunt T. (1983) Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **33**, 389-396.
- Feinberg A. P. and Vogelstein B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical biochemistry* **132**, 6-13.
- Feine O., Zur A., Mahbubani H. and Brandeis M. (2007) Human Kid is degraded by the APC/C(Cdh1) but not by the APC/C(Cdc20). *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **6**, 2516-2523.
- Fernandez P. C., Frank S. R., Wang L., Schroeder M., Liu S., Greene J., Cocito A. and Amati B. (2003) Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes & development* **17**, 1115-1129.
- Fero M. L., Randel E., Gurley K. E., Roberts J. M. and Kemp C. J. (1998) The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature* **396**, 177-180.
- Fredlund E., Ringner M., Maris J. M. and Pahlman S. (2008) High Myc pathway activity and low stage of neuronal differentiation associate with poor outcome in neuroblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 14094-14099.
- Fruhwald M. C., O'Dorisio M. S., Rush L. J., Reiter J. L., Smiraglia D. J., Wenger G., Costello J. F., White P. S., Krahe R., Brodeur G. M. and Plass C. (2000) Gene amplification in PNETs/medulloblastomas: mapping of a novel amplified gene within the MYCN amplicon. *J Med Genet* **37**, 501-509.

- Gabellini D., Colaluca I. N., Vodermaier H. C., Biamonti G., Giacca M., Falaschi A., Riva S. and Peverali F. A. (2003) Early mitotic degradation of the homeoprotein HOXC10 is potentially linked to cell cycle progression. *The EMBO journal* **22**, 3715-3724.
- Garcia-Higuera I., Manchado E., Dubus P., Canamero M., Mendez J., Moreno S. and Malumbres M. (2008) Genomic stability and tumour suppression by the APC/C cofactor Cdh1. *Nature cell biology* **10**, 802-811.
- Garson J. A., McIntyre P. G. and Kemshead J. T. (1985) N-myc amplification in malignant astrocytoma. *Lancet* **2**, 718-719.
- Geley S., Kramer E., Gieffers C., Gannon J., Peters J. M. and Hunt T. (2001) Anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis of human cyclin A starts at the beginning of mitosis and is not subject to the spindle assembly checkpoint. *The Journal of cell biology* **153**, 137-148.
- Genchi G. and Olson J. A. (2001) Retinoylation of proteins in cell-free fractions of rat tissues in vitro. *Biochimica et biophysica acta* **1530**, 146-154.
- Gieffers C., Peters B. H., Kramer E. R., Dotti C. G. and Peters J. M. (1999) Expression of the CDH1-associated form of the anaphase-promoting complex in postmitotic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 11317-11322.
- Glotzer M., Murray A. W. and Kirschner M. W. (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**, 132-138.
- Godbout R. and Squire J. (1993) Amplification of a DEAD box protein gene in retinoblastoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7578-7582.
- Gordon D. M. and Roof D. M. (2001) Degradation of the kinesin Kip1p at anaphase onset is mediated by the anaphase-promoting complex and Cdc20p. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 12515-12520.
- Gratacos M., Nadal M., Martin-Santos R., Pujana M. A., Gago J., Peral B., Armengol L., Ponsa I., Miro R., Bulbena A. and Estivill X. (2001) A polymorphic genomic duplication on human chromosome 15 is a susceptibility factor for panic and phobic disorders. *Cell* **106**, 367-379.
- Gstaiger M., Jordan R., Lim M., Catzavelos C., Mestan J., Slingerland J. and Krek W. (2001) Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 5043-5048.
- Guardavaccaro D., Kudo Y., Boulaire J., Barchi M., Busino L., Donzelli M., Margottin-Goguet F., Jackson P. K., Yamasaki L. and Pagano M. (2003) Control of meiotic and mitotic progression by the F box protein beta-Trcp1 in vivo. *Developmental cell* **4**, 799-812.
- Hames R. S., Wattam S. L., Yamano H., Bacchieri R. and Fry A. M. (2001) APC/C-mediated destruction of the centrosomal kinase Nek2A occurs in early mitosis and depends upon a cyclin A-type D-box. *The EMBO journal* **20**, 7117-7127.
- Harper J. W., Burton J. L. and Solomon M. J. (2002) The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes & development* **16**, 2179-2206.
- Herrero-Mendez A., Almeida A., Fernandez E., Maestre C., Moncada S. and Bolanos J. P. (2009) The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nature cell biology* **11**, 747-752.
- Hershko A. (1983) Ubiquitin: roles in protein modification and breakdown. *Cell* **34**, 11-12.

Hershko D., Bornstein G., Ben-Izhak O., Carrano A., Pagano M., Krausz M. M. and Hershko A. (2001) Inverse relation between levels of p27(Kip1) and of its ubiquitin ligase subunit Skp2 in colorectal carcinomas. *Cancer* **91**, 1745-1751.

Hildebrandt E. R. and Hoyt M. A. (2001) Cell cycle-dependent degradation of the *Saccharomyces cerevisiae* spindle motor Cin8p requires APC(Cdh1) and a bipartite destruction sequence. *Molecular biology of the cell* **12**, 3402-3416.

Ho R., Eggert A., Hishiki T., Minturn J. E., Ikegaki N., Foster P., Camoratto A. M., Evans A. E. and Brodeur G. M. (2002) Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer research* **62**, 6462-6466.

Holland A. J. and Taylor S. S. (2006) Cyclin-B1-mediated inhibition of excess separase is required for timely chromosome disjunction. *Journal of cell science* **119**, 3325-3336.

Hsu J. Y., Reimann J. D., Sorensen C. S., Lukas J. and Jackson P. K. (2002) E2F-dependent accumulation of hEmi1 regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1). *Nature cell biology* **4**, 358-366.

Huang H., Regan K. M., Wang F., Wang D., Smith D. I., van Deursen J. M. and Tindall D. J. (2005) Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 1649-1654.

Hui A. B., Lo K. W., Yin X. L., Poon W. S. and Ng H. K. (2001) Detection of multiple gene amplifications in glioblastoma multiforme using array-based comparative genomic hybridization. *Lab Invest* **81**, 717-723.

Jeganathan K. B., Malureanu L. and van Deursen J. M. (2005) The Rael-Nup98 complex prevents aneuploidy by inhibiting securin degradation. *Nature* **438**, 1036-1039.

Jeganathan K. B., Baker D. J. and van Deursen J. M. (2006) Securin associates with APCCdh1 in prometaphase but its destruction is delayed by Rael and Nup98 until the metaphase/anaphase transition. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **5**, 366-370.

Johnsen J. I., Kogner P., Albiñ A. and Henriksson M. A. (2009) Embryonal neural tumours and cell death. *Apoptosis* **14**, 424-438.

Johnsen J. I., Segerstrom L., Orrego A., Elfman L., Henriksson M., Kagedal B., Eksborg S., Sveinbjornsson B. and Kogner P. (2008) Inhibitors of mammalian target of rapamycin downregulate MYCN protein expression and inhibit neuroblastoma growth in vitro and in vivo. *Oncogene* **27**, 2910-2922.

Jones-Villeneuve E. M., McBurney M. W., Rogers K. A. and Kalnins V. I. (1982) Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *The Journal of cell biology* **94**, 253-262.

Juang Y. L., Huang J., Peters J. M., McLaughlin M. E., Tai C. Y. and Pellman D. (1997) APC-mediated proteolysis of Ase1 and the morphogenesis of the mitotic spindle. *Science (New York, N.Y)* **275**, 1311-1314.

Kalitsis P., Earle E., Fowler K. J. and Choo K. H. (2000) Bub3 gene disruption in mice reveals essential mitotic spindle checkpoint function during early embryogenesis. *Genes & development* **14**, 2277-2282.

Kamei Y., Xu L., Heinzl T., Torchia J., Kurokawa R., Gloss B., Lin S. C., Heyman R. A., Rose D. W., Glass C. K. and Rosenfeld M. G. (1996) A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* **85**, 403-414.

Kamura T., Hara T., Matsumoto M., Ishida N., Okumura F., Hatakeyama S., Yoshida M., Nakayama K. and Nakayama K. I. (2004) Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1) at G1 phase. *Nature cell biology* **6**, 1229-1235.

Kang T. I., Brophy P., Hickeson M., Heyman S., Evans A. E., Charron M. and Maris J. M. (2003) Targeted radiotherapy with submyeloablative doses of ¹³¹I-MIBG is

effective for disease palliation in highly refractory neuroblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol* **25**, 769-773.

Kawaguchi R., Yu J., Honda J., Hu J., Whitelegge J., Ping P., Wiita P., Bok D. and Sun H. (2007) A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science (New York, N.Y)* **315**, 820-825.

Kawamata N., Morosetti R., Miller C. W., Park D., Spirin K. S., Nakamaki T., Takeuchi S., Hatta Y., Simpson J., Wilczynski S. and et al. (1995) Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27/Kip1 in human malignancies. *Cancer research* **55**, 2266-2269.

Kawana H., Tamaru J., Tanaka T., Hirai A., Saito Y., Kitagawa M., Mikata A., Harigaya K. and Kuriyama T. (1998) Role of p27Kip1 and cyclin-dependent kinase 2 in the proliferation of non-small cell lung cancer. *The American journal of pathology* **153**, 505-513.

Khan A. A., Villablanca J. G., Reynolds C. P. and Avramis V. I. (1996) Pharmacokinetic studies of 13-cis-retinoic acid in pediatric patients with neuroblastoma following bone marrow transplantation. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **39**, 34-41.

King R. W., Glotzer M. and Kirschner M. W. (1996) Mutagenic analysis of the destruction signal of mitotic cyclins and structural characterization of ubiquitinated intermediates. *Molecular biology of the cell* **7**, 1343-1357.

Knoepfler P. S., Cheng P. F. and Eisenman R. N. (2002) N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. *Genes & development* **16**, 2699-2712.

Konishi Y., Stegmuller J., Matsuda T., Bonni S. and Bonni A. (2004) Cdh1-APC controls axonal growth and patterning in the mammalian brain. *Science (New York, N.Y)* **303**, 1026-1030.

Kossatz U., Dietrich N., Zender L., Buer J., Manns M. P. and Malek N. P. (2004) Skp2-dependent degradation of p27kip1 is essential for cell cycle progression. *Genes & development* **18**, 2602-2607.

Kotani S., Tugendreich S., Fujii M., Jorgensen P. M., Watanabe N., Hoog C., Hieter P. and Todokoro K. (1998) PKA and MPF-activated polo-like kinase regulate anaphase-promoting complex activity and mitosis progression. *Molecular cell* **1**, 371-380.

Kraft C., Herzog F., Gieffers C., Mechtler K., Hagting A., Pines J. and Peters J. M. (2003) Mitotic regulation of the human anaphase-promoting complex by phosphorylation. *The EMBO journal* **22**, 6598-6609.

Kramer E. R., Scheuringer N., Podtelejnikov A. V., Mann M. and Peters J. M. (2000) Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1. *Molecular biology of the cell* **11**, 1555-1569.

Kudo Y., Kitajima S., Sato S., Miyauchi M., Ogawa I. and Takata T. (2001) High expression of S-phase kinase-interacting protein 2, human F-box protein, correlates with poor prognosis in oral squamous cell carcinomas. *Cancer research* **61**, 7044-7047.

Kuenzli S., Tran C. and Saurat J. H. (2004) Retinoid receptors in inflammatory responses: a potential target for pharmacology. *Current drug targets* **3**, 355-360.

Lane M. A. and Bailey S. J. (2005) Role of retinoid signalling in the adult brain. *Progress in neurobiology* **75**, 275-293.

Larsen N. A. and Harrison S. C. (2004) Crystal structure of the spindle assembly checkpoint protein Bub3. *Journal of molecular biology* **344**, 885-892.

Latres E., Chiarle R., Schulman B. A., Pavletich N. P., Pellicer A., Inghirami G. and Pagano M. (2001) Role of the F-box protein Skp2 in lymphomagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 2515-2520.

- Lee J. H. and Kim K. T. (2004) Induction of cyclin-dependent kinase 5 and its activator p35 through the extracellular-signal-regulated kinase and protein kinase A pathways during retinoic-acid mediated neuronal differentiation in human neuroblastoma SK-N-BE(2)C cells. *Journal of neurochemistry* **91**, 634-647.
- Lee W. H., Murphree A. L. and Benedict W. F. (1984) Expression and amplification of the N-myc gene in primary retinoblastoma. *Nature* **309**, 458-460.
- Liao Y. P., Ho S. Y. and Liou J. C. (2004) Non-genomic regulation of transmitter release by retinoic acid at developing motoneurons in *Xenopus* cell culture. *Journal of cell science* **117**, 2917-2924.
- Lindon C. and Pines J. (2004) Ordered proteolysis in anaphase inactivates Plk1 to contribute to proper mitotic exit in human cells. *The Journal of cell biology* **164**, 233-241.
- Littlepage L. E. and Ruderman J. V. (2002) Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. *Genes & development* **16**, 2274-2285.
- Loda M., Cukor B., Tam S. W., Lavin P., Fiorentino M., Draetta G. F., Jessup J. M. and Pagano M. (1997) Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nature medicine* **3**, 231-234.
- Lotan R. and Nicolson G. L. (1977) Inhibitory effects of retinoic acid or retinyl acetate on the growth of untransformed, transformed, and tumor cells in vitro. *Journal of the National Cancer Institute* **59**, 1717-1722.
- Lucarelli E., Kaplan D. R. and Thiele C. J. (1995) Selective regulation of TrkA and TrkB receptors by retinoic acid and interferon-gamma in human neuroblastoma cell lines. *The Journal of biological chemistry* **270**, 24725-24731.
- Lukas J. and Bartek J. (2004) Cell division: the heart of the cycle. *Nature* **432**, 564-567.
- Lutz W. and Schwab M. (1997) In vivo regulation of single copy and amplified N-myc in human neuroblastoma cells. *Oncogene* **15**, 303-315.
- Maden M. (2002) Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat Rev Neurosci* **3**, 843-853.
- Maden M. (2007) Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* **8**, 755-765.
- Maestre C., Delgado-Esteban M., Gomez-Sanchez J. C., Bolanos J. P. and Almeida A. (2008) Cdk5 phosphorylates Cdh1 and modulates cyclin B1 stability in excitotoxicity. *The EMBO journal* **27**, 2736-2745.
- Malumbres M. and Barbacid M. (2005) Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in biochemical sciences* **30**, 630-641.
- Malumbres M. and Barbacid M. (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews* **9**, 153-166.
- Malynn B. A., de Alboran I. M., O'Hagan R. C., Bronson R., Davidson L., DePinho R. A. and Alt F. W. (2000) N-myc can functionally replace c-myc in murine development, cellular growth, and differentiation. *Genes & development* **14**, 1390-1399.
- Mamillapalli R., Gavrilova N., Mihaylova V. T., Tsvetkov L. M., Wu H., Zhang H. and Sun H. (2001) PTEN regulates the ubiquitin-dependent degradation of the CDK inhibitor p27(KIP1) through the ubiquitin E3 ligase SCF(SKP2). *Curr Biol* **11**, 263-267.
- Mao Y., Abrieu A. and Cleveland D. W. (2003) Activating and silencing the mitotic checkpoint through CENP-E-dependent activation/inactivation of BubR1. *Cell* **114**, 87-98.
- Margottin-Goguet F., Hsu J. Y., Loktev A., Hsieh H. M., Reimann J. D. and Jackson P. K. (2003) Prophase destruction of Emi1 by the SCF(betaTrCP/Slimb) ubiquitin ligase

activates the anaphase promoting complex to allow progression beyond prometaphase. *Developmental cell* **4**, 813-826.

Maris J. M., Hogarty M. D., Bagatell R. and Cohn S. L. (2007) Neuroblastoma. *Lancet* **369**, 2106-2120.

Mark M., Ghyselinck N. B. and Chambon P. (2006) Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. *Annual review of pharmacology and toxicology* **46**, 451-480.

Masuda T. A., Inoue H., Sonoda H., Mine S., Yoshikawa Y., Nakayama K., Nakayama K. and Mori M. (2002) Clinical and biological significance of S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2) gene expression in gastric carcinoma: modulation of malignant phenotype by Skp2 overexpression, possibly via p27 proteolysis. *Cancer research* **62**, 3819-3825.

Matsuo T. and Thiele C. J. (1998) p27Kip1: a key mediator of retinoic acid induced growth arrest in the SMS-KCNR human neuroblastoma cell line. *Oncogene* **16**, 3337-3343.

Matthay K. K., Villablanca J. G., Seeger R. C., Stram D. O., Harris R. E., Ramsay N. K., Swift P., Shimada H., Black C. T., Brodeur G. M., Gerbing R. B. and Reynolds C. P. (1999) Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *The New England journal of medicine* **341**, 1165-1173.

Maurer B. J., Metelitsa L. S., Seeger R. C., Cabot M. C. and Reynolds C. P. (1999) Increase of ceramide and induction of mixed apoptosis/necrosis by N-(4-hydroxyphenyl)-retinamide in neuroblastoma cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* **91**, 1138-1146.

McMahon S. B., Wood M. A. and Cole M. D. (2000) The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Molecular and cellular biology* **20**, 556-562.

Meitar D., Crawford S. E., Rademaker A. W. and Cohn S. L. (1996) Tumor angiogenesis correlates with metastatic disease, N-myc amplification, and poor outcome in human neuroblastoma. *J Clin Oncol* **14**, 405-414.

Menssen A., Epanchintsev A., Lodygin D., Rezaei N., Jung P., Verdoodt B., Diebold J. and Hermeking H. (2007) c-MYC delays prometaphase by direct transactivation of MAD2 and BubR1: identification of mechanisms underlying c-MYC-induced DNA damage and chromosomal instability. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **6**, 339-352.

Mey J. and McCaffery P. (2004) Retinoic acid signaling in the nervous system of adult vertebrates. *Neuroscientist* **10**, 409-421.

Meyer N. and Penn L. Z. (2008) Reflecting on 25 years with MYC. *Nature reviews* **8**, 976-990.

Michel L. S., Liberal V., Chatterjee A., Kirchwegger R., Pasche B., Gerald W., Dobles M., Sorger P. K., Murty V. V. and Benezra R. (2001) MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature* **409**, 355-359.

Miloso M., Villa D., Crimi M., Galbiati S., Donzelli E., Nicolini G. and Tredici G. (2004) Retinoic acid-induced neuritogenesis of human neuroblastoma SH-SY5Y cells is ERK independent and PKC dependent. *Journal of neuroscience research* **75**, 241-252.

Miller J. J., Summers M. K., Hansen D. V., Nachury M. V., Lehman N. L., Loktev A. and Jackson P. K. (2006) Emi1 stably binds and inhibits the anaphase-promoting complex/cyclosome as a pseudosubstrate inhibitor. *Genes & development* **20**, 2410-2420.

- Mora J., Gerald W. L., Qin J. and Cheung N. K. (2002) Evolving significance of prognostic markers associated with treatment improvement in patients with stage 4 neuroblastoma. *Cancer* **94**, 2756-2765.
- Nair S. K. and Burley S. K. (2006) Structural aspects of interactions within the Myc/Max/Mad network. *Current topics in microbiology and immunology* **302**, 123-143.
- Nakamura M., Matsuo T., Stauffer J., Neckers L. and Thiele C. J. (2003) Retinoic acid decreases targeting of p27 for degradation via an N-myc-dependent decrease in p27 phosphorylation and an N-myc-independent decrease in Skp2. *Cell death and differentiation* **10**, 230-239.
- Nakamura N., Ramaswamy S., Vazquez F., Signoretti S., Loda M. and Sellers W. R. (2000) Forkhead transcription factors are critical effectors of cell death and cell cycle arrest downstream of PTEN. *Molecular and cellular biology* **20**, 8969-8982.
- Nakayama K. I. and Nakayama K. (2005) Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases. *Seminars in cell & developmental biology* **16**, 323-333.
- Nakayama K. I. and Nakayama K. (2006) Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nature reviews* **6**, 369-381.
- Nguyen L., Besson A., Heng J. I., Schuurmans C., Teboul L., Parras C., Philpott A., Roberts J. M. and Guillemot F. (2006) p27kip1 independently promotes neuronal differentiation and migration in the cerebral cortex. *Genes & development* **20**, 1511-1524.
- Ochoa W. F., Torrecillas A., Fita I., Verdaguer N., Corbalan-Garcia S. and Gomez-Fernandez J. C. (2003) Retinoic acid binds to the C2-domain of protein kinase C(alpha). *Biochemistry* **42**, 8774-8779.
- Ohtsuka T., Ryu H., Minamishima Y. A., Macip S., Sagara J., Nakayama K. I., Aaronson S. A. and Lee S. W. (2004) ASC is a Bax adaptor and regulates the p53-Bax mitochondrial apoptosis pathway. *Nature cell biology* **6**, 121-128.
- Pagano M., Pepperkok R., Lukas J., Baldin V., Ansorge W., Bartek J. and Draetta G. (1993) Regulation of the cell cycle by the cdk2 protein kinase in cultured human fibroblasts. *The Journal of cell biology* **121**, 101-111.
- Pagano M., Tam S. W., Theodoras A. M., Beer-Romero P., Del Sal G., Chau V., Yew P. R., Draetta G. F. and Rolfe M. (1995) Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science (New York, N.Y)* **269**, 682-685.
- Pahlman S., Odelstad L., Larsson E., Grotte G. and Nilsson K. (1981) Phenotypic changes of human neuroblastoma cells in culture induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *International journal of cancer* **28**, 583-589.
- Pan J., Kao Y. L., Joshi S., Jeetendran S., Dipette D. and Singh U. S. (2005) Activation of Rac1 by phosphatidylinositol 3-kinase in vivo: role in activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways and retinoic acid-induced neuronal differentiation of SH-SY5Y cells. *Journal of neurochemistry* **93**, 571-583.
- Passmore L. A., McCormack E. A., Au S. W., Paul A., Willison K. R., Harper J. W. and Barford D. (2003) Doc1 mediates the activity of the anaphase-promoting complex by contributing to substrate recognition. *The EMBO journal* **22**, 786-796.
- Patton E. E., Willems A. R., Sa D., Kuras L., Thomas D., Craig K. L. and Tyers M. (1998) Cdc53 is a scaffold protein for multiple Cdc34/Skp1/F-box protein complexes that regulate cell division and methionine biosynthesis in yeast. *Genes & development* **12**, 692-705.
- Perini G., Diolaiti D., Porro A. and Della Valle G. (2005) In vivo transcriptional regulation of N-Myc target genes is controlled by E-box methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 12117-12122.

- Peters J. M. (2002) The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Molecular cell* **9**, 931-943.
- Peters J. M. (2006) The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 644-656.
- Peters J. M., King R. W., Hoog C. and Kirschner M. W. (1996) Identification of BIME as a subunit of the anaphase-promoting complex. *Science (New York, N.Y)* **274**, 1199-1201.
- Pfleger C. M. and Kirschner M. W. (2000) The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes & development* **14**, 655-665.
- Piva R., Cancelli I., Cavalla P., Bortolotto S., Dominguez J., Draetta G. F. and Schiffer D. (1999) Proteasome-dependent degradation of p27/kip1 in gliomas. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **58**, 691-696.
- Plum L. A., Parada L. F., Tsoulfas P. and Clagett-Dame M. (2001) Retinoic acid combined with neurotrophin-3 enhances the survival and neurite outgrowth of embryonic sympathetic neurons. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J)* **226**, 766-775.
- Polyak K., Lee M. H., Erdjument-Bromage H., Koff A., Roberts J. M., Tempst P. and Massague J. (1994) Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* **78**, 59-66.
- Prinz S., Hwang E. S., Visintin R. and Amon A. (1998) The regulation of Cdc20 proteolysis reveals a role for APC components Cdc23 and Cdc27 during S phase and early mitosis. *Curr Biol* **8**, 750-760.
- Pritchard C. E., Fornerod M., Kasper L. H. and van Deursen J. M. (1999) RAE1 is a shuttling mRNA export factor that binds to a GLEBS-like NUP98 motif at the nuclear pore complex through multiple domains. *The Journal of cell biology* **145**, 237-254.
- Reijntjes S., Gale E. and Maden M. (2004) Generating gradients of retinoic acid in the chick embryo: Cyp26C1 expression and a comparative analysis of the Cyp26 enzymes. *Dev Dyn* **230**, 509-517.
- Reimann J. D., Gardner B. E., Margottin-Goguet F. and Jackson P. K. (2001a) Emi1 regulates the anaphase-promoting complex by a different mechanism than Mad2 proteins. *Genes & development* **15**, 3278-3285.
- Reimann J. D., Freed E., Hsu J. Y., Kramer E. R., Peters J. M. and Jackson P. K. (2001b) Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex. *Cell* **105**, 645-655.
- Reis A., Lévasséur M., Chang H. Y., Elliott D. J. and Jones K. T. (2006) The CRY box: a second APC^{cdh1}-dependent degron in mammalian cdc20. *EMBO reports* **7**, 1040-1045.
- Reynolds C. P., Matthay K. K., Villablanca J. G. and Maurer B. J. (2003) Retinoid therapy of high-risk neuroblastoma. *Cancer letters* **197**, 185-192.
- Reynolds C. P., Schindler P. F., Jones D. M., Gentile J. L., Proffitt R. T. and Einhorn P. A. (1994) Comparison of 13-cis-retinoic acid to trans-retinoic acid using human neuroblastoma cell lines. *Progress in clinical and biological research* **385**, 237-244.
- Reynolds C. P., Kane D. J., Einhorn P. A., Matthay K. K., Crouse V. L., Wilbur J. R., Shurin S. B. and Seeger R. C. (1991) Response of neuroblastoma to retinoic acid in vitro and in vivo. *Progress in clinical and biological research* **366**, 203-211.
- Rodier G., Montagnoli A., Di Marcotullio L., Coulombe P., Draetta G. F., Pagano M. and Meloche S. (2001) p27 cytoplasmic localization is regulated by phosphorylation on Ser10 and is not a prerequisite for its proteolysis. *The EMBO journal* **20**, 6672-6682.

- Rodriguez-Tebar A. and Rohrer H. (1991) Retinoic acid induces NGF-dependent survival response and high-affinity NGF receptors in immature chick sympathetic neurons. *Development (Cambridge, England)* **112**, 813-820.
- Ross R. A., Spengler B. A. and Biedler J. L. (1983) Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *Journal of the National Cancer Institute* **71**, 741-747.
- Rouah E., Wilson D. R., Armstrong D. L. and Darlington G. J. (1989) N-myc amplification and neuronal differentiation in human primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Cancer Res* **49**, 1797-1801.
- Russo A. A., Jeffrey P. D., Patten A. K., Massague J. and Pavletich N. P. (1996) Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* **382**, 325-331.
- Saffiotti U., Montesano R., Sellakumar A. R. and Borg S. A. (1967) Experimental cancer of the lung. Inhibition by vitamin A of the induction of tracheobronchial squamous metaplasia and squamous cell tumors. *Cancer* **20**, 857-864.
- Savelyeva L., Claas A., Matzner I., Schlag P., Hofmann W., Scherneck S., Weber B. and Schwab M. (2001) Constitutional genomic instability with inversions, duplications, and amplifications in 9p23-24 in BRCA2 mutation carriers. *Cancer research* **61**, 5179-5185.
- Schule R., Rangarajan P., Yang N., Kliwer S., Ransone L. J., Bolado J., Verma I. M. and Evans R. M. (1991) Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 6092-6096.
- Schutz B. R., Scheurlen W., Krauss J., du Manoir S., Joos S., Bentz M. and Lichter P. (1996) Mapping of chromosomal gains and losses in primitive neuroectodermal tumors by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* **16**, 196-203.
- Schwab M. (1998) Amplification of oncogenes in human cancer cells. *Bioessays* **20**, 473-479.
- Schwab M. (2004) MYCN in neuronal tumours. *Cancer letters* **204**, 179-187.
- Schwab M., Varmus H. E. and Bishop J. M. (1985) Human N-myc gene contributes to neoplastic transformation of mammalian cells in culture. *Nature* **316**, 160-162.
- Schwab M., Neutzner M., Mocker D. and Seufert W. (2001) Yeast Hct1 recognizes the mitotic cyclin Clb2 and other substrates of the ubiquitin ligase APC. *The EMBO journal* **20**, 5165-5175.
- Schwab M., Westermann F., Hero B. and Berthold F. (2003) Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *The lancet oncology* **4**, 472-480.
- Schwab M., Varmus H. E., Bishop J. M., Grzeschik K. H., Naylor S. L., Sakaguchi A. Y., Brodeur G. and Trent J. (1984) Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc. *Nature* **308**, 288-291.
- Schwab M., Alitalo K., Klempnauer K. H., Varmus H. E., Bishop J. M., Gilbert F., Brodeur G., Goldstein M. and Trent J. (1983) Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* **305**, 245-248.
- Schweigerer L., Breit S., Wenzel A., Tsunamoto K., Ludwig R. and Schwab M. (1990) Augmented MYCN expression advances the malignant phenotype of human neuroblastoma cells: evidence for induction of autocrine growth factor activity. *Cancer research* **50**, 4411-4416.
- Seeger R. C., Brodeur G. M., Sather H., Dalton A., Siegel S. E., Wong K. Y. and Hammond D. (1985) Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *The New England journal of medicine* **313**, 1111-1116.

Shimada H., Chatten J., Newton W. A., Jr., Sachs N., Hamoudi A. B., Chiba T., Marsden H. B. and Misugi K. (1984) Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *Journal of the National Cancer Institute* **73**, 405-416.

Sidell N., Altman A., Haussler M. R. and Seeger R. C. (1983) Effects of retinoic acid (RA) on the growth and phenotypic expression of several human neuroblastoma cell lines. *Experimental cell research* **148**, 21-30.

Slack A., Chen Z., Tonelli R., Pule M., Hunt L., Pession A. and Shohet J. M. (2005) The p53 regulatory gene MDM2 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 731-736.

Smith M. A., Adamson P. C., Balis F. M., Feusner J., Aronson L., Murphy R. F., Horowitz M. E., Reaman G., Hammond G. D., Fenton R. M. and et al. (1992) Phase I and pharmacokinetic evaluation of all-trans-retinoic acid in pediatric patients with cancer. *J Clin Oncol* **10**, 1666-1673.

Squire J., Gallie B. L. and Phillips R. A. (1985) A detailed analysis of chromosomal changes in heritable and non-heritable retinoblastoma. *Hum Genet* **70**, 291-301.

Stanton L. W., Schwab M. and Bishop J. M. (1986) Nucleotide sequence of the human N-myc gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 1772-1776.

Stewart S. and Fang G. (2005a) Destruction box-dependent degradation of aurora B is mediated by the anaphase-promoting complex/cyclosome and Cdh1. *Cancer research* **65**, 8730-8735.

Stewart S. and Fang G. (2005b) Anaphase-promoting complex/cyclosome controls the stability of TPX2 during mitotic exit. *Molecular and cellular biology* **25**, 10516-10527.

Strickland S. and Mahdavi V. (1978) The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. *Cell* **15**, 393-403.

Strieder V. and Lutz W. (2002) Regulation of N-myc expression in development and disease. *Cancer letters* **180**, 107-119.

Sudakin V., Chan G. K. and Yen T. J. (2001) Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *The Journal of cell biology* **154**, 925-936.

Sutterluty H., Chatelain E., Marti A., Wirbelauer C., Senften M., Muller U. and Krek W. (1999) p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells. *Nature cell biology* **1**, 207-214.

T. M. (1967) Effect of vitamin A deficiency in animals: pharmacology and toxicology of vitamin A. *Sebrell, Harris, eds. The Vitamins. New York Academic Press* **1**, 245.

Takahashi N., Sausville E. A. and Breitman T. R. (1995) N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (Fenretinide) in combination with retinoic acid enhances differentiation and retinoylation of proteins. *Clin Cancer Res* **1**, 637-642.

Thiele C. (1998) Neuroblastoma Cell Lines. *J. Human Cell Culture. Lancaster, UK. Kluwer Academic Publishers* **1**, 21-53.

Thiele C. J., Reynolds C. P. and Israel M. A. (1985) Decreased expression of N-myc precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. *Nature* **313**, 404-406.

Tumilowicz J. J., Nichols W. W., Cholon J. J. and Greene A. E. (1970) Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma. *Cancer research* **30**, 2110-2118.

Uhlmann F., Lottspeich F. and Nasmyth K. (1999) Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* **400**, 37-42.

- Ved H. S. and Pieringer R. A. (1993) Regulation of neuronal differentiation by retinoic acid alone and in cooperation with thyroid hormone or hydrocortisone. *Developmental neuroscience* **15**, 49-53.
- Villablanca J. G., Khan A. A., Avramis V. I., Seeger R. C., Matthay K. K., Ramsay N. K. and Reynolds C. P. (1995) Phase I trial of 13-cis-retinoic acid in children with neuroblastoma following bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* **13**, 894-901.
- Vodermaier H. C., Gieffers C., Maurer-Stroh S., Eisenhaber F. and Peters J. M. (2003) TPR subunits of the anaphase-promoting complex mediate binding to the activator protein CDH1. *Curr Biol* **13**, 1459-1468.
- Wang Q., Liu T., Fang Y., Xie S., Huang X., Mahmood R., Ramaswamy G., Sakamoto K. M., Darzynkiewicz Z., Xu M. and Dai W. (2004) BUBR1 deficiency results in abnormal megakaryopoiesis. *Blood* **103**, 1278-1285.
- Wang X., Babu J. R., Harden J. M., Jablonski S. A., Gazi M. H., Lingle W. L., de Groen P. C., Yen T. J. and van Deursen J. M. (2001) The mitotic checkpoint protein hBUB3 and the mRNA export factor hRAE1 interact with GLE2p-binding sequence (GLEBS)-containing proteins. *The Journal of biological chemistry* **276**, 26559-26567.
- Wei W., Ayad N. G., Wan Y., Zhang G. J., Kirschner M. W. and Kaelin W. G., Jr. (2004) Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. *Nature* **428**, 194-198.
- Wenzel A., Cziepluch C., Hamann U., Schurmann J. and Schwab M. (1991) The N-Myc oncoprotein is associated in vivo with the phosphoprotein Max(p20/22) in human neuroblastoma cells. *The EMBO journal* **10**, 3703-3712.
- Westermann F., Henrich K. O., Wei J. S., Lutz W., Fischer M., Konig R., Wiedemeyer R., Ehemann V., Brors B., Ernestus K., Leuschner I., Benner A., Khan J. and Schwab M. (2007) High Skp2 expression characterizes high-risk neuroblastomas independent of MYCN status. *Clin Cancer Res* **13**, 4695-4703.
- Westermann F., Muth D., Benner A., Bauer T., Henrich K. O., Oberthuer A., Brors B., Beissbarth T., Vandesompele J., Pattyn F., Hero B., Konig R., Fischer M. and Schwab M. (2008) Distinct transcriptional MYCN/c-MYC activities are associated with spontaneous regression or malignant progression in neuroblastomas. *Genome biology* **9**, R150.
- Wilson L. and Maden M. (2005) The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Developmental biology* **282**, 1-13.
- Wimmer K., Zhu X. X., Lamb B. J., Kuick R., Ambros P. F., Kovar H., Thoraval D., Motyka S., Alberts J. R. and Hanash S. M. (1999) Co-amplification of a novel gene, NAG, with the N-myc gene in neuroblastoma. *Oncogene* **18**, 233-238.
- Wirbelauer C., Sutterluty H., Blondel M., Gstaiger M., Peter M., Reymond F. and Krek W. (2000) The F-box protein Skp2 is a ubiquitylation target of a Cull1-based core ubiquitin ligase complex: evidence for a role of Cull1 in the suppression of Skp2 expression in quiescent fibroblasts. *The EMBO journal* **19**, 5362-5375.
- Wyatt S., Andres R., Rohrer H. and Davies A. M. (1999) Regulation of neurotrophin receptor expression by retinoic acid in mouse sympathetic neuroblasts. *J Neurosci* **19**, 1062-1071.
- Yamano H., Gannon J., Mahbubani H. and Hunt T. (2004) Cell cycle-regulated recognition of the destruction box of cyclin B by the APC/C in Xenopus egg extracts. *Molecular cell* **13**, 137-147.
- Yamasaki L. and Pagano M. (2004) Cell cycle, proteolysis and cancer. *Current opinion in cell biology* **16**, 623-628.
- Yokoi S., Yasui K., Iizasa T., Takahashi T., Fujisawa T. and Inazawa J. (2003) Down-regulation of SKP2 induces apoptosis in lung-cancer cells. *Cancer science* **94**, 344-349.

- Yokoi S., Yasui K., Mori M., Iizasa T., Fujisawa T. and Inazawa J. (2004) Amplification and overexpression of SKP2 are associated with metastasis of non-small-cell lung cancers to lymph nodes. *The American journal of pathology* **165**, 175-180.
- Yu Y. M., Han P. L. and Lee J. K. (2003) JNK pathway is required for retinoic acid-induced neurite outgrowth of human neuroblastoma, SH-SY5Y. *Neuroreport* **14**, 941-945.
- Yuan Z., Becker E. B., Merlo P., Yamada T., DiBacco S., Konishi Y., Schaefer E. M. and Bonni A. (2008) Activation of FOXO1 by Cdk1 in cycling cells and postmitotic neurons. *Science (New York, N.Y)* **319**, 1665-1668.
- Zachariae W., Schwab M., Nasmyth K. and Seufert W. (1998) Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science (New York, N.Y)* **282**, 1721-1724.
- Zancai P., Dal Col J., Piccinin S., Guidoboni M., Cariati R., Rizzo S., Boiocchi M., Maestro R. and Dolcetti R. (2005) Retinoic acid stabilizes p27Kip1 in EBV-immortalized lymphoblastoid B cell lines through enhanced proteasome-dependent degradation of the p45Skp2 and Cks1 proteins. *Oncogene* **24**, 2483-2494.
- Zeller K. I., Jegga A. G., Aronow B. J., O'Donnell K. A. and Dang C. V. (2003) An integrated database of genes responsive to the Myc oncogenic transcription factor: identification of direct genomic targets. *Genome biology* **4**, R69.
- Zhang H., Kobayashi R., Galaktionov K. and Beach D. (1995) p19Skp1 and p45Skp2 are essential elements of the cyclin A-CDK2 S phase kinase. *Cell* **82**, 915-925.
- Zou H., McGarry T. J., Bernal T. and Kirschner M. W. (1999) Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science (New York, N.Y)* **285**, 418-422.
- Zur A. and Brandeis M. (2001) Securin degradation is mediated by fzy and fzr, and is required for complete chromatid separation but not for cytokinesis. *The EMBO journal* **20**, 792-801.