



PARP-1 COMO REGULADOR DEL CICLO CELULAR

Pablo Iglesias Vázquez

Facultade de Medicina
Departamento de Fisioloxía



D. José Antonio Costoya Puente, profesor del Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela,

CERTIFICA:

Que la presente tesis doctoral titulada “PARP-1 COMO REGULADOR DEL CICLO CELULAR” elaborada por el Licenciado en Química D. Pablo Iglesias Vázquez, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela, y hallándose concluida, autoriza su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Santiago de Compostela, a 25 de marzo del 2015.

Fdo. **José Antonio Costoya Puente**

Fdo. **Pablo Iglesias Vázquez**



Agradecimientos

A mi director de tesis, Jose Antonio, por abrirme la puerta al mundo de la investigación y por los consejos recibidos durante todos estos años.

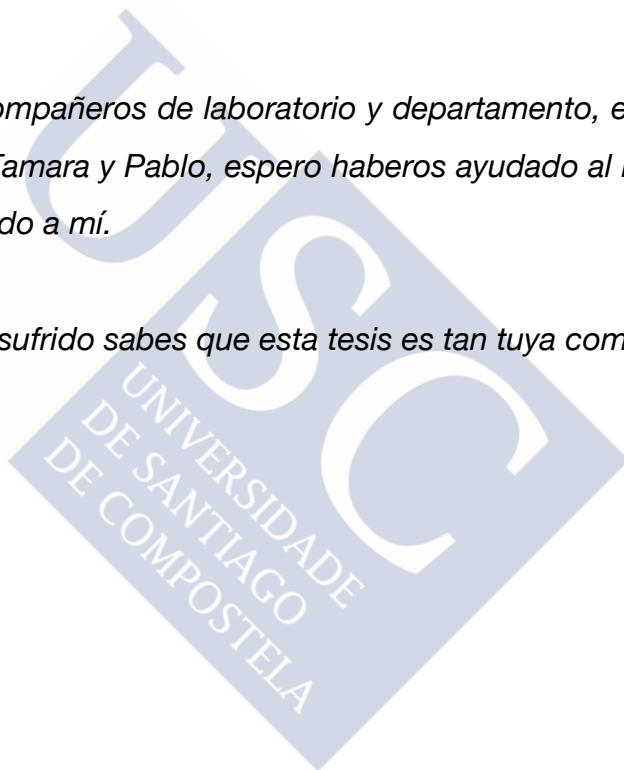
A Marcos e Isa, mi más sincero cariño y admiración, sin vuestro apoyo no hubiese sido capaz de llegar hasta el final.

A Marcos Ríos, Juan y Efi, me siento honrado de poder reconocer a buenos amigos en vosotros.

A mis compañeras y compañeros de laboratorio y departamento, en especial a Irene, Ana, Cris, Susi, Tamara y Pablo, espero haberos ayudado al menos tanto como me habéis ayudado a mí.

A Vir, por lo que la has sufrido sabes que esta tesis es tan tuya como mía.

A mis padres, por todo.







ABREVIATURAS



Abreviaturas

3-AB: 3-aminobenzamida.

ARTD (*ADP-ribosyltransferase*): ADP-ribosa transferasa.

ATM (*ataxia telangiectasia mutated kinase 1/2*)

ATP (*adenosine triphosphate*): adenosín trifosfato.

BER (*base excision repair*): reparación por escisión de nucleótidos.

BRCT (*BRCA1 C Terminus*).

cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*): adenosín monofosfato cíclico.

CDKs (*cyclin-dependent kinases*): quinasas dependientes de ciclinas.

ChIP (*chromatin immunoprecipitation*): inmunoprecipitación de cromatina.

CKI (*CDK Inhibitors*): inhibidores de CDKs.

DDR (*DNA-Damage checkpoint Response*): respuesta de daño al DNA.

DSBR (*double-strand break repair*): reparación de rotura de doble cadena.

EGFR (*epidermal growth factor receptor*): receptor del factor de crecimiento epidérmico.

EdU: 5-Etínil-2'-deoxiuridina.

GAPs (*GTPase-activating proteins*): proteínas activadoras de la actividad GTPasa.

GDP (*guanosine diphosphate*): guanosín difosfato.

GEF (*guanine nucleotide exchange factor*): factor de intercambio de nucleótidos de guanina.

GH (*growth hormone*): hormona del crecimiento.

GPCRs (*G protein-coupled receptors*): receptores asociados a proteínas G.

GTFs (*general transcription factor*): factores generales de transcripción.

GTP (*guanosine triphosphate*): guanosín trifosfato.

HDACs (*histone deacetylases*): deacetilasas de histonas.

LOH (*loss of heterozygosity*): pérdida de heterocigosidad.

MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*): quinasas activadas por mitógenos.

MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*): fibroblastos embrionarios de ratón.

NAM (*nicotinamide adenosine mononucleotide*): mononucleótido nicotinamida.

NAD⁺ (*nicotinamide adenine dinucleotide*): nicotinamida adenina dinucleótido.

nRTKs (*non-receptor tyrosine kinases*): tirosina quinasas no receptoras.

OIS (*oncogene-induced senescence*): senescencia inducida por oncogenes.

PARG (*poly(ADP-ribose) glycohydrolase*): poli(ADP-ribosa) glicohidrolasa.

PARP (*poly(ADP ribose) polymerase*): poli(ADP-ribosa) polimerasa.

PGK (*phosphoglycerate kinase promoter*): promotor de la fosfoglicerato quinasa.

pRB (*retinoblastoma protein*): proteína del retinoblastoma.

RLU (*relative luminescence unit*): unidad relativa de luminiscencia.

RTKs (*receptor tyrosine kinases*): receptores tirosina quinasa.

ROS (*reactive oxygen species*): especies reactivas de oxígeno.

SSBR (*single-strand break repair*): reparación de rotura de cadena simple.

TKD (*tyrosine kinase domain*): dominio tirosina quinasa.

TopBP1 (*DNA topoisomerase II β binding protein*).

TSHR (*thyroid stimulating hormone receptor*): receptor de la hormona tirotrópica.

TMZ: temozolomida.

WIP1 (*Wild-type p53-Induced Phosphatase 1*).





TABLA DE CONTENIDOS



INTRODUCCIÓN **21**

EL PROCESO ONCOGÉNICO **21**

EL PROCESO ONCOGÉNICO: ONCOGENES Y SUPRESORES DE TUMORES 23

REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO Y PROLIFERACIÓN POR RUTAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR **24**

RECEPTORES TIROSINA QUINASA 25

RECEPTORES ASOCIADOS A TIROSINA QUINASA 26

RECEPTORES ASOCIADOS A PROTEÍNAS G 27

 LA VÍA DE RAS 29

EL CICLO CELULAR Y SU REGULACIÓN **31**

REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR MEDIANTE LOS COMPLEJOS CICLINAS-CDKS 32

RETINOBLASTOMA (PRB) Y REGULACIÓN DE CICLO 34

LA REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN **37**

LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN 37

E2F-1 Y CICLO CELULAR 40

DIANAS TRANSCRIPCIONALES DE E2F-1 42

PAPEL DE E2F-1 EN DESARROLLO Y CÁNCER 43

MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE E2F-1 INDEPENDIENTE DE PRB 44

LA FAMILIA DE LAS POLI(ADP-RIBOSA)POLIMERASAS **45**

ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE PARP-1 47

FUNCIONES EN EL NÚCLEO: REPARACIÓN Y MANTENIMIENTO DEL GENOMA 49

 REPARACIÓN DEL DNA 50

 MITOSIS 51

 REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL MODULADA POR PARP-1 52

INHIBIDORES DE PARP-1 55

 DESARROLLO Y APLICACIONES DE LOS INHIBIDORES DE PARP-1 57

OBJETIVOS **63**

MATERIALES Y MÉTODOS	67
RATONES MODIFICADOS GENÉTICAMENTE	67
CULTIVOS CELULARES Y TRATAMIENTOS	69
PLÁSMIDOS	74
PCR SEMI-CUANTITATIVA	76
MICROSCOPIA CONFOCAL	77
ENSAYOS DE ACTIVIDAD LUCIFERASA Y BETA-GALACTOSIDASA	78
INMUNOPRECIPITACIÓN	79
INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA	80
CURVAS DE PROLIFERACIÓN	81
ENSAYOS DE TRANSFORMACIÓN CELULAR	81
SENESCENCIA Y CUANTIFICACIÓN DE LA APOPTOSIS	82
INMUNOBLOT	83
HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA	83
RESULTADOS	87
ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN PARP-1/E2F-1 <i>IN VITRO</i>	87
ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN PARP-1/E2F-1 DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO	102
ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN PARP-1/E2F-1 EN UN MODELO DE ONCOGÉNESIS	110
INHIBIDORES DE PARP-1	110
RESCATE DE LA DEFICIENCIA DE PARP-1	116
ENSAYOS DE TRANSFORMACIÓN <i>IN VIVO</i>	118
DISCUSIÓN	123
CONCLUSIONES	133
BIBLIOGRAFÍA	137



RESUMEN



Resumen

En el presente estudio hemos querido investigar las implicaciones biológicas de la interacción PARP-1/E2F-1 en escenarios en los que el factor de transcripción E2F-1 resulta de gran importancia como son el desarrollo embrionario y la oncogénesis. En este respecto, hemos demostrado que tanto PJ34, inhibidor de la actividad enzimática de PARP, como gossipol, inhibidor de las interacciones proteína-proteína, son capaces de reducir la actividad transcripcional de E2F-1 y la proliferación de las células tratadas. Además, esta interacción parece estar relacionada con el represor transcripcional TopBP1, el cual también interacciona con E2F-1.

El papel de PARP-1 como co-activador de E2F-1 no se limita a su papel como regulador del ciclo celular sino que su participación es importante durante el desarrollo embrionario tal y como se deduce de la observación de los embriones *Parp-1^{-/-} Rb^{-/-}*, los cuales desarrollan un fenotipo similar al de los ratones *E2f-1^{-/-} Rb^{-/-}*. En cuanto a las implicaciones de esta interacción sobre el proceso oncogénico, la delección o inhibición de PARP-1 protege a la célula frente a estímulos oncogénicos al reducir su tasa proliferativa, tanto *in vivo* como *in vitro*, o bien al reactivar otras rutas de señalización celular implicadas en la senescencia inducida por oncogénesis.





INTRODUCCIÓN



Introducción

1. El proceso oncogénico

La compleja organización de los organismos pluricelulares complejos (metazoos) se debe en gran medida al grado de autonomía e individualidad del que disponen los "ladrillos" que conforman sus tejidos y órganos, esto es, las células. Estas células, en su mayor parte al menos, están dotadas de secuencias genómicas completas y son capaces de crecer y reproducirse durante toda la vida del individuo, dotándolo de la capacidad de mantener y reparar tejidos y órganos durante su etapa adulta. Sin embargo, esta autonomía celular conlleva ciertos riesgos que pueden comprometer el correcto funcionamiento y programación de la célula. De entre estos riesgos cabe destacar como frecuentes la alteración de las secuencias genómicas, o bien la activación aberrante de determinadas secuencias genómicas que en condiciones normales estarían silenciadas. Estas divergencias del comportamiento celular normal tienen como resultado nuevos fenotipos que son habitualmente incompatibles con las funciones biológicas que cada célula tiene asignada en sus órganos y tejidos originales. La aparición de estos fenotipos, normalmente asociados con una hiperproliferación celular, son el resultado de un proceso gradual que se produce por la acumulación progresiva de mutaciones en la secuencia de determinados genes. Aunque estas mutaciones alteran la información de los genes que las contienen, éstas no son transferidas a la siguiente generación a menos que se produzcan en las células de la línea germinal (óvulos o espermatozoides).

La aparición de fenotipos tumorales no es un proceso repentino sino que sucede de manera gradual y requiere de varias mutaciones somáticas, tal y como expusieron Armitage y Doll en 1954 en lo que se conoce como teoría multiescenario del cáncer (Armitage y Doll, 1954). Como mencionamos anteriormente, algunas de las mutaciones confieren a la célula una rápida proliferación que a su vez promueve la adquisición de nuevas mutaciones, en parte debido a una reparación del DNA menos eficiente por parte de la célula

transformada. Es por ello sencillo imaginar el proceso tumoral como una selección similar a la evolución darwiniana, en la que la frecuencia alélica de una población se ve alterada con el paso del tiempo al fijar las alteraciones o mutaciones que confieren una ventaja reproductiva. Este proceso se desarrolla en varios pasos consecutivos pero no inmediatos, ya que pueden requerir de varias generaciones para completarse, y que se pueden describir como expansiones clonales (**Figura 1**). De esta manera, la selección de poblaciones mutadas iniciales sucede de manera más lenta mientras que selecciones posteriores son aceleradas por la acumulación de mutaciones que hacen aumentar significativamente las poblaciones celulares. Esta selección da lugar a subpoblaciones con un grado de malignización y agresividad con respecto a las poblaciones celulares de las que proceden. Además, no sólo la aparición de mutaciones aleatorias influye en esta selección ya que no hay que descartar la influencia de otros procesos epigenéticos heredables como es el silenciamiento de genes mediante la metilación de promotores.

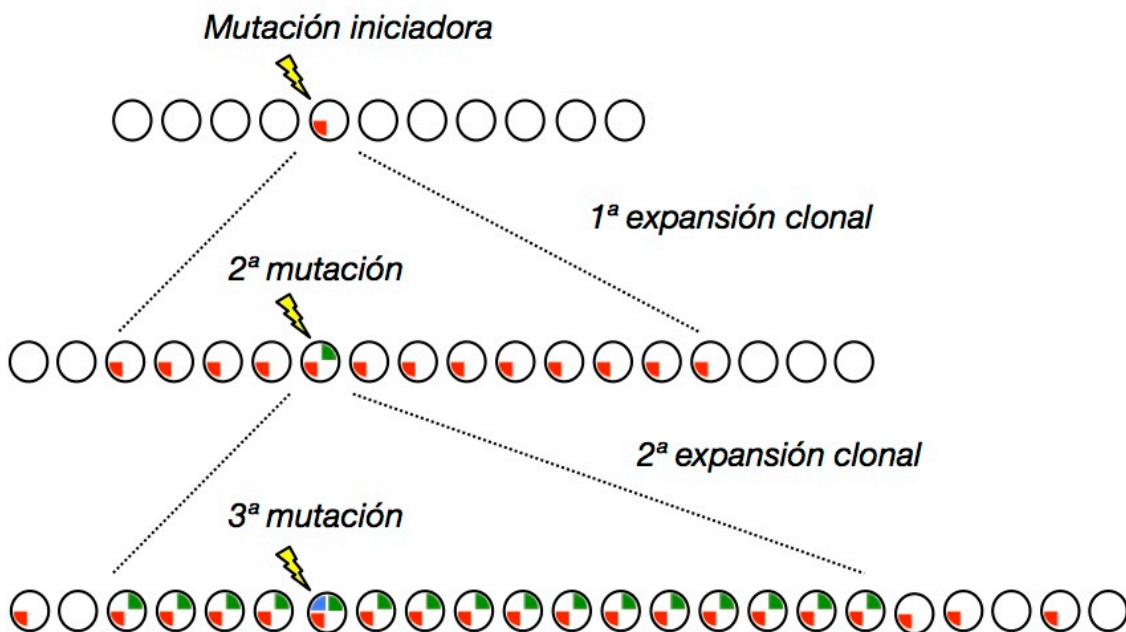


Figura 1.- Expansión clonal de las mutaciones en el proceso oncogénico. Una de las células experimenta una mutación que tiene asociada una ventaja proliferativa y se produce la primera expansión clonal. En el momento en el que la población mutante alcanza un número suficiente, aumenta la probabilidad de que una célula ya mutada experimente una segunda mutación que dará lugar a otra expansión clonal de células portadoras de ambas mutaciones. (Adaptado de Weinberg, 2013).

1.1. *El proceso oncogénico: oncogenes y supresores de tumores*

Estas mutaciones responsables de la transformación celular pueden ser agrupadas en dos grandes grupos dependiendo de los tipos de genes en los que se producen. El primer grupo engloba las mutaciones que suelen afectar a genes implicados en la homeostasis y crecimiento celular, y por ello sujetos a una estricta regulación transcripcional. Las mutaciones que afectan a estos **oncogenes** producen una ganancia de función que estimula la proliferación celular contribuyendo de manera positiva al proceso oncogénico. Esta ganancia de función de los oncogenes suele estar asociada a la aparición de múltiples copias del gen en la misma célula o bien a versiones alteradas de la proteína que producen una activación constitutiva de su función. En cuanto al tipo de proteínas que cae dentro de esta clasificación cabe mencionar a los factores de crecimiento y sus receptores, o a otras proteínas encargadas de la recepción y transducción de señales extracelulares como pueden ser proteínas asociadas a la membrana o proteínas citoplasmáticas implicadas en vías de señalización intracelular. Es necesario mencionar el posible origen vírico de algunos oncogenes como es el caso de los virus de sarcoma de Harvey y Kristen que portan a los oncogenes H-*ras* y K-*ras*, respectivamente. Otros como el ALV o MLV no portan oncogenes pero son capaces de inducir una transformación tumoral integrando numerosas copias de sus genomas en el organismo infectado activando a proto-oncogenes como *c-myc*. De manera alternativa, aunque menos frecuente, proteínas de virus como el HLTV-I pueden activar la transcripción de factores de crecimiento celulares como IL-2 o GM-CSF (Weinberg, 2013).

Por otra parte, los **supresores de tumores** son reguladores negativos del crecimiento cuyas mutaciones inactivan o reducen la actividad de la proteína que codifican facilitando el crecimiento descontrolado y la malignización celular. De manera similar a los oncogenes, las proteínas que codifican contribuyen de manera esencial al correcto desarrollo celular y entre ellos se cuentan factores de transcripción, proteínas reguladoras del ciclo

celular, implicadas en la reparación del DNA o que regulan otros mecanismos de defensa de la célula como la apoptosis o la senescencia. (Kinzler y Vogelstein, 1993; Marx, 1994). De forma general, la transmisión de estas mutaciones suele ser de carácter recesivo ya que para que la pérdida de función de estos supresores tumorales ocurra ambos alelos del gen se han de ver afectados por la mutación. En una primera etapa, uno de los alelos es inactivado bien por una mutación o mediante un fenómeno epigenético como es la metilación del gen. Finalmente, el alelo intacto acaba por ser eliminado de igual manera, generalmente mediante la pérdida de heterocigosidad (LOH).

Curiosamente, en el caso de la fosfatasa PTEN, la pérdida de un solo alelo es suficiente para alterar el crecimiento celular e inducir una hiperproliferación en células de varios tejidos. Este hecho pone de manifiesto la haploinsuficiencia de PTEN en la supresión tumoral y la importancia de la dosis génica en el potencial oncogénico de las células que tienen afectada esta proteína (Di Cristofano *et al.*, 1998; Trotman *et al.*, 2003).

2. Regulación del crecimiento y proliferación por rutas de señalización celular

Las células de los organismos multicelulares son capaces de comunicarse utilizando una gran variedad de moléculas señalizadoras que incluyen a proteínas, aminoácidos, nucleótidos, esteroides y pequeños péptidos entre otros. Por medio de estas moléculas mediadoras, las células reciben señales de su propio entorno que estimulan su crecimiento. Estas señales extracelulares son recogidas por varias clases de receptores específicos que interaccionan con las moléculas intermediarias, transmitiendo el estímulo al interior de la célula donde será interpretado por complejos circuitos en su interior que decidirán si el crecimiento o división celular inducidos deben tener lugar o no.

2.1. Receptores tirosina quinasa

Los receptores tirosina quinasa (TRKs) son uno de los grupos más numerosos dentro de las clases de quinasas conocidas, contando con 58 miembros conocidos repartidos en 20 subfamilias. Todos ellos comparten una estructura similar compuesta por dominios de unión a los ligandos dispuestos en la región extracelular, una única hélice transmembrana y una región citosólica que contiene la fracción de la proteína con actividad tirosina quinasa, aparte de otras regiones reguladoras localizadas en el extremo C-terminal de la proteína. En cuanto al mecanismo de acción del receptor, en ausencia de ligando los receptores se encuentran en reposo y no transmiten ninguna señal. Una vez unido el ligando, ambos receptores se agrupan formando dímeros u oligómeros haciendo que el dominio quinasa del receptor transfiera un grupo fosfato (del ATP) a residuos tirosina del dominio intracelular de otra molécula de receptor al que se encuentre asociada (Lemmon *et al.*, 2010). La reorganización de los dominios quinasa en el citosol permite a otros dominios quinasa de cadenas de receptores vecinas fosforilarse mutuamente en más de un residuo tirosina en un proceso de autofosforilación. Este proceso por una parte incrementa la actividad de la enzima, como en el caso del receptor de insulina (Cobb *et al.*, 1989), además de generar nuevos sitios de unión de proteínas transductoras de señales intracelulares. A su vez, estas proteínas se unirán a otros residuos fosforilados del receptor activado y diferentes de la fosfotirosina en los que serán activadas y/o fosforiladas. Esta autofosforilación actúa como punto de partida de una cadena de ensamblaje de un complejo señalizador que transducirá las señales extracelulares hacia sus respectivos destinos en el interior de la célula, desencadenando diferentes respuestas dependiendo de su naturaleza.

Además de la regulación de la activación del receptor, muchos de los RTKs cuentan con un mecanismo de autoinhibición-*cis* por elementos anexos al dominio tirosina quinasa (TKD), normalmente de la región de

yuxtamembrana del receptor. Una mutación habitual en tumores consiste en la disrupción de las interacciones autoinhibitorias de yuxtamembrana que tiene como resultado en la familia KIT/PDGFR la activación constitutiva de los receptores (Dibb *et al.*, 2004). Un ejemplo de esta disrupción se encuentra en el caso del gen *v-erbB*, presente en el virus de la eritroblastosis aviar y que presenta una secuencia altamente similar a la del receptor de EGF (*epidermal growth factor*). El producto de este gen consiste en una forma truncada de EGFR que carece del dominio extracelular y del extremo C-terminal citosólico. De esta manera, no sólo desaparece la regulación del receptor por el mecanismo de autoinhibición sino que la activación del receptor se produce de manera independiente a la unión del ligando, que tiene como consecuencia el envío de señales mitogénicas hacia el interior de la célula y por consiguiente un crecimiento descontrolado que desemboca en la transformación celular (Merlino *et al.*, 1984; Downward *et al.*, 1984).

2.2. Receptores asociados a tirosinas quinasa

A diferencia de los RTKs, no poseen actividad quinasa por sí mismos y dependen de tirosinas quinasa citosólicas a las que se encuentran asociados. En cuanto a las quinasa, como es obvio, éstas carecen de un dominio extracelular de unión al ligando y región transmembrana, Al igual que en el caso de los receptores tirosina quinasa, la fosforilación de residuos tirosina de las quinasa no receptores (nRTKs) durante el bucle de activación induce un aumento de la actividad enzimática. La fosforilación de tirosinas fuera de esta etapa de activación puede reducir la actividad catalítica de la proteína. Incluidas en este grupo se encuentran varias familias de nRTKs, como es el caso de Src. En el caso concreto de esta familia de quinasa, sus miembros contienen dominios SH2 y SH3 localizados en el interior de la membrana citoplasmática y que se unen a ella por medio de su interacción con los receptores y también de manera covalente a cadenas lipídicas. La unión del ligando al receptor produce un cambio conformacional en su dominio

citoplasmático que a su vez activa a la quinasa asociada (Filippakopoulos *et al.*, 2009).

Las integrinas que reconocen componentes de la matriz extracelular es otro ejemplo de receptor que requiere la asociación con una tirosina quinasa. En este caso, la tirosina quinasa FAK se une a la cola citosólica de una de las subunidades de la integrina y se fosforila generando lugares de unión para la quinasa Src, con la que colabora. Src a su vez *trans*-fosforila a FAK y a otras proteínas, transmitiendo a la célula la unión de un sustrato apropiado. Por último, las citoquinas constituyen la familia de esta clase de receptores más amplia y heterogénea, ya que incluye a algunas hormonas como la del crecimiento (GH) y la prolactina. Asociadas a estos receptores se encuentran proteínas tirosina quinasa como JAK, responsables de la activación de las proteínas reguladoras de la expresión génica conocidas como STATs. Estas proteínas STAT se encuentran inactivadas en localizaciones cercanas a la membrana celular. La activación del receptor asociado a JAK produce su correspondiente activación y posterior migración hacia el núcleo, donde ejercerán su actividad reguladora.

2.3. Receptores asociados a proteínas G

Los receptores asociados a proteínas G (GPCRs) son uno de los grupos más numerosos y diversos de proteínas de membrana, contando con más de 800 genes en el genoma humano (Fredriksson *et al.*, 2003). Este tipo de receptores es capaz de detectar una gran variedad de señales extracelulares incluyendo fotones, iones, pequeñas moléculas orgánicas y proteínas. A pesar de esta diversidad química y funcional de las moléculas señal que captan, casi todas comparten características estructurales comunes. Estos receptores están formados por tres regiones o dominios localizados en el exterior de la célula, su interior y transversalmente en la membrana celular. Como su nombre indica, también se encuentran asociados a las proteínas G, proteínas

triméricas de unión a GTP, y que actuarán como transductores de la señal hacia el interior de la célula (Venkatakrisnan *et al.*, 2013).

Una vez el ligando se une al receptor, los GPCRs sufren una serie de cambios conformacionales que producen la activación de cascadas de señalización transmitiendo la señal que resultará en una señal celular apropiada. Por su parte, las proteínas G en su estado basal son inactivas y están unidas a GDP (guanosín difosfato) por medio de su subunidad α . Cuando el receptor es estimulado, la subunidad α libera al GDP tomando en su lugar a GTP (guanosín trifosfato). La unión de GTP produce la separación de las tres subunidades de la proteína G, disociándolas en la subunidad α y el complejo $\beta\gamma$. Mientras que la subunidad α experimenta una serie de cambios en su conformación para poder interactuar con sus proteínas diana, el complejo $\beta\gamma$ permanece inalterado listo para interactuar con sus proteínas específicas. Estas dianas o proteínas específicas son enzimas o canales iónicos de la membrana plasmática que a su vez activan las vías de señalización intracelular, además de la rápida generación de multitud de segundos mensajeros (Pierce *et al.*, 2002). Para finalizar el proceso, la subunidad α hidroliza el GTP, que pasa a GDP, y se reasocia al complejo $\beta\gamma$ para formar la proteína G de nuevo (Digby *et al.*, 2006).

El AMP cíclico es una molécula derivada de la catálisis del adenosín trifosfato (ATP) por medio de la adenilato ciclasa, una enzima asociada a la membrana plasmática. El cAMP es considerado un segundo mensajero, lo que significa que es una molécula de señalización intracelular encargada de la puesta en marcha de cascadas de transducción de señales que regulan procesos como la proliferación, la diferenciación, migración o apoptosis. La concentración intracelular de cAMP se ve afectada en función de diversas señales extracelulares que bien aumentan con la actividad de la adenilato ciclasa, o se reducen al disminuir la actividad de las fosfodiesterasas. Además de la regulación de segundos mensajeros como AMP cíclico (cAMP), los GPCR intervienen en la migración, supervivencia y crecimiento de la célula al

activar varias cascadas de quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) como ERK1/2, JNK1-3, p38 α - β MAPKs y ERK5 entre otros (Gutkind *et al.*, 1998).

También son conocidos diversos oncogenes que codifican proteínas de receptores asociados a proteínas G como es el caso del receptor de la hormona tirotrópica (TSHR) y que aparece mutado en carcinomas tiroideos, causando la continua activación del receptor y un crecimiento celular sobreestimulado (Parma *et al.*, 1993).

2.3.1. La vía de Ras

Además de las proteínas G heterotriméricas, otras proteínas G intervienen en procesos fundamentales para la célula. Estas proteínas pertenecen a una gran superfamilia conocida como las proteínas G pequeñas, o *small GTPases*, nombre que reciben debido a su bajo peso molecular (de 20000 a 35000 Daltons). Estas proteínas, al igual que las proteínas G heterotriméricas poseen actividad GTPasa alternando fases de unión a GDP y GTP. Quizás el ejemplo más ilustrativo de *small GTPases* implicadas en oncogenes implica a la familia de proteínas G conocidas como RAS (HRAS, KRAS, NRAS) y de la que hablaremos a continuación.

Las proteínas RAS son pequeñas proteínas G monoméricas que actúan como transductores de señales extracelulares recogidas por los receptores a los que están asociados, tal y como explicamos anteriormente. En humanos se conocen tres genes que codifican cuatro proteínas de 21 kDa, con una alta homología entre sí: HRAS, NRAS, KRAS4A y KRAS4B, siendo estas dos últimas *splicings* alternativos del mismo gen (Barbacid, 1987; Bourne *et al.*, 1990; Vetter y Wittinghofer, 2001). En condiciones fisiológicas, estas proteínas se encuentran unidas a la cara interna de la membrana donde alternan entre la forma inactiva, que se encuentra unida al difosfato GDP y la activa, unida al trifosfato GTP, con la que interacciona con otras moléculas efectoras y con proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAPs) (Downward, 1996). Otras

proteínas reguladoras de la actividad de RAS incluyen a los factores intercambiadores de nucleótidos GEF, los cuales promueven el reemplazo del GDP unido a RAS. Como resultado, se produce una estimulación de la actividad GTPasa y se acelera el intercambio de GDP por GTP, aumentando por consiguiente la actividad de las proteínas RAS (Ahmadian *et al.*, 1997). La **Figura 2** muestra el mecanismo de regulación de RAS por medio de la GTPasa (RAS-GAP) y la RAS-GEF.

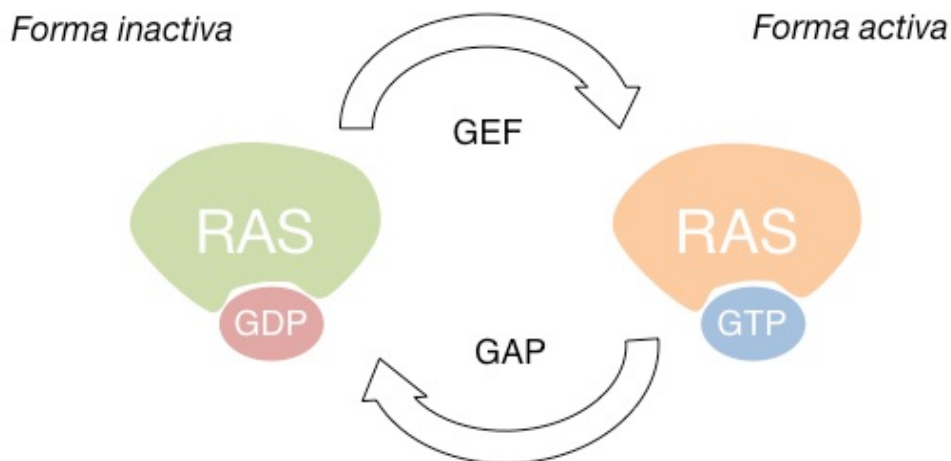


Figura 2. Mecanismo de regulación de RAS por medio de la GTPasa (RAS-GAP) y la RAS-GEF.

En las células tumorales los mecanismos de control de la respuesta a estímulos mitogénicos y antimitogénicos a menudo se encuentran alterados con el objetivo de adquirir una ventaja pro-proliferativa, al igual que ocurre con otros mecanismos de control. Las proteínas RAS, como reguladoras inmediatas de estos estímulos mitogénicos suelen presentar mutaciones que comportan su activación constitutiva o continua. Por esto mismo, es frecuente la aparición de mutaciones somáticas en la glutamina 61 (Q61), responsable de la catálisis en RAS, o en los residuos G12 y G13, que reducen la capacidad de hidrólisis de GTP dando como resultado la retención del GTP y por tanto la activación ininterrumpida de las rutas de señalización dependientes de RAS (Scheffzek *et al.*, 1997; Buhrman *et al.*, 2010).

La frecuencia de variantes mutadas de las proteínas Ras encontradas en diferentes tipos de tumores resalta la importancia de estas proteínas y su

papel en la regulación de la proliferación celular. Así, mientras que en líneas generales entre un 20 y un 30% del total de tumores humanos presentan mutaciones en miembros de esta familia, algunos tipos tumorales demuestran una mayor frecuencia de mutaciones en la isoforma KRAS. Según la base de datos de mutaciones somáticas en cáncer COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>), es el caso del adenocarcinoma de páncreas, con un 57% de casos con KRAS mutado mientras las otras dos isoformas apenas lo están en un 2%, o cáncer colorrectal con el 31% de los casos para KRAS frente al 1% de NRAS (Pylayeva-Gupta *et al.*, 2011).

3. El ciclo celular y su regulación

Todas las células, sean bacterias unicelulares o eucariotas que forman complejos organismos pluricelulares, experimentan lo que se conoce como ciclo celular. Este ciclo consiste en la secuencia organizada de procesos implicados con el crecimiento, replicación del DNA, segregación de cromosomas y finalmente mitosis de la célula para dar lugar a dos células hijas. Este ciclo puede dividirse en varias fases, dependiendo del estado en el que se encuentre la célula. De esta forma, en las interfases G_1 y G_2 comprenden los mecanismos de crecimiento de la célula y transición hasta la fase de síntesis de DNA (S) o hasta la mitosis (M) o división celular. De manera adicional podemos describir una fase de quiescencia (G_0) en el que las células mantienen en pausa su programa de crecimiento/división y que adoptan como resultado de la ausencia de señales mitogénicas externas durante el comienzo de la fase G_1 hasta el punto de restricción (R), el cual tiene lugar varias horas antes de la transición G_1/S .

Las transiciones entre las distintas fases se producen de manera ordenada y son estrictamente reguladas por diversos mecanismos de control puestos en juego por la célula. Mientras que en el punto de control de la fase G_1 (transición G_1/S) se verifica el nivel energético de la célula además de la

disponibilidad de nutrientes y su volumen, en el punto de control de la G_2 (transición G_2/M) se verifica la integridad del DNA duplicado en la anterior fase S y además se comprueba la correcta alineación de los cromosomas antes de proceder con la separación de las cromátidas hermanas (transición metafase/anafase).

Sin embargo, la célula no transiciona entre la síntesis de nuevo DNA y la mitosis de manera ininterrumpida. Para que la duplicación del DNA tenga lugar de nuevo la célula experimenta en la interfase G_1 una duplicación del citoplasma y membranas, número de orgánulos y proteínas ya que de lo contrario podría producirse una inestabilidad del tamaño celular comprometiendo su viabilidad. Sin embargo, esta restricción parece no suceder en la embriogénesis o en procesos oncogénicos (Heichman y Roberts, 1994; Nurse, 1994; Sherr, 1994).

3.1. Regulación del ciclo celular mediante los complejos ciclinas-CDKs

Los componentes centrales de la regulación del ciclo celular son miembros de una familia de quinasas conocidas como las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). La actividad de estas proteínas progresa a medida que el ciclo avanza produciendo cambios cíclicos en la fosforilación de otras proteínas implicadas en la regulación o iniciación del ciclo celular. Por ejemplo, un aumento en la actividad de las CDKs en la transición G_2/M supone un aumento en la fosforilación de las proteínas que regulan eventos relacionados con el comienzo de la mitosis como son la condensación de los cromosomas, la ruptura de la membrana nuclear o el ensamblaje del huso mitótico.

Estos cambios en la actividad de las proteínas CDK están controlados por un complejo circuito de enzimas y otras proteínas. Dentro de estas proteínas reguladoras de las CDKs podemos identificar a las ciclinas como las más importantes, ya que como su nombre indica dependen de su unión a ellas para ejercer su actividad. Al contrario que las CDKs, cuyos niveles apenas varían con respecto al ciclo, estas proteínas sufren cambios sucesivos de síntesis y degradación dependiendo de la fase del ciclo en la que se

encuentren. La **Figura 3** muestra un esquema de la sucesión de las fases del ciclo celular y los complejos ciclinas-CDKs que guían cada uno de los pasos de control.

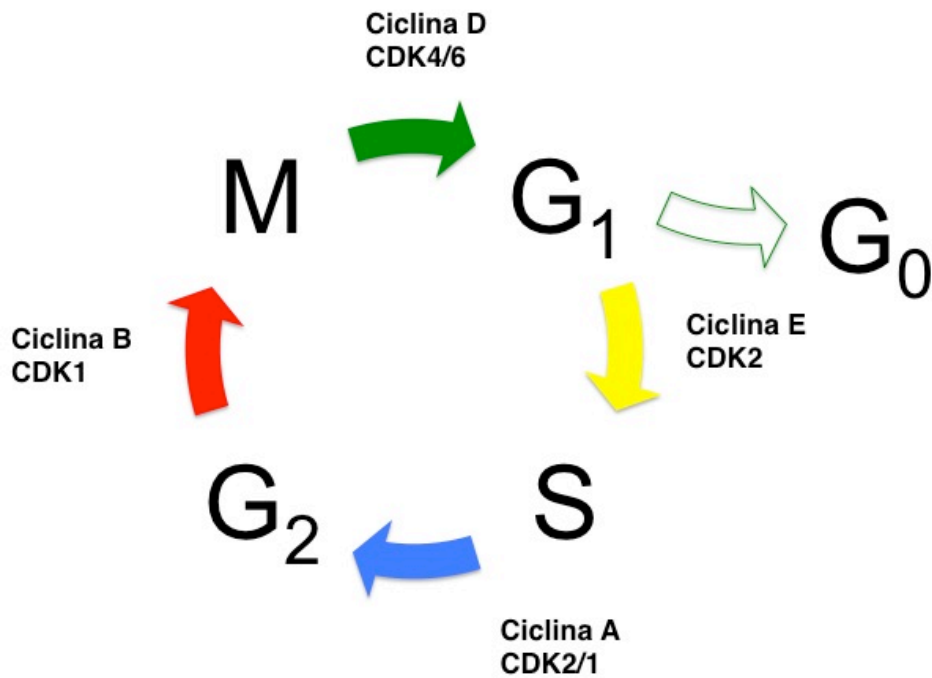


Figura 3.- Esquema simplificado del ciclo celular.

Estas ciclinas se clasifican en cuatro clases dependiendo de la fase del ciclo en la que se unen a las CDKs. Así, mientras que las **ciclinas G₁/S** regulan la transición entre la fase de crecimiento G₁ a la de síntesis de DNA (S), las **ciclinas S** se unen a las CDKs durante los primeros instantes de la fase estimulando la duplicación del material genético que se dividirá en las dos células hijas y que regularán las **ciclinas M**. Curiosamente, los niveles de ciclinas S permanecen elevados hasta la fase M y controlan algunos de los eventos tempranos de la mitosis. Por último, las **ciclinas G₁** se encargan de regular la actividad de las G₁/S, completando el ciclo celular. De esta manera, los complejos ciclinas-CDKs, en equilibrio con los inhibidores y activadores de ciclo, son considerados como elementos integradores de las señales extracelulares e intracelulares y que por tanto regulan la progresión del ciclo celular. (Graña *et al.*, 1995; Sherr *et al.*, 1996; Malumbres *et al.*, 2001).

3.2. Retinoblastoma (pRb) y regulación de ciclo

Como mencionamos anteriormente, la progresión entre las distintas fases del ciclo, incluyendo la reentrada desde el estado quiescente G_0 , se produce de manera ordenada y sucesiva preparándose la célula previamente para cada paso en las fases intermedias o *gaps*. De esta manera, en la etapa G_1 la célula sintetiza mRNAs y proteínas anticipándose a la síntesis del DNA (fase S) y que continuará con la duplicación del material genético y finalmente la mitosis (fase M). El paso de G_1 a S es particularmente dependiente del tamaño celular, de los estímulos mitogénicos presentes y también de la ausencia de inhibidores de la proliferación. En mamíferos, el producto del gen supresor de tumores retinoblastoma (pRB) y miembros de su familia denominada *pocket proteins* (p107 y p130) actúan como reguladores de la transición G_1/S , inhibiendo la actividad del factor de transcripción E2F-1 y que a su vez regula a un número de genes necesarios para la entrada en el ciclo celular y la síntesis del DNA (Brehm *et al.*, 1998; Harrington *et al.*, 1998; Dyson, 1998; Bracken *et al.*, 2004).

Aunque la literatura suele centrarse en la contribución que la actividad aberrante de E2F tiene sobre el ciclo celular y el proceso oncogénico, cada día son más las pruebas que relacionan la inactivación de pRb con la alteración de otros procesos celulares. Es conocido el efecto de la delección o inactivación de pRb sobre la organización de la cromatina, diferenciación, mitosis, apoptosis, autofagia, equilibrio redox y metabolismo (McLeod, 2008; Manning y Dyson, 2012; Dick y Rubin, 2013). Esta multiplicidad de efectos sobre la regulación celular pone de manifiesto el importante papel regulador de pRb, lo que también se refleja en el gran número de tipos tumorales que comparten mutaciones relacionadas con esta proteína (Malumbres *et al.*, 2001; Bosco *et al.*, 2007; Knudsen *et al.*, 2008) y que de manera resumida encontramos resaltados en la página siguiente, en la **Figura 4**.

et al., 1993a). Como respuesta a señales mitogénicas los complejos ciclinas-CDKs como ciclina D-Cdk4/6 y ciclina E-Cdk2, fosforilan a pRB produciendo cambios estructurales en la proteína. Estas modificaciones alostéricas en la estructura de pRB producen que la avidez por E2F-1 disminuya de manera pronunciada liberando al factor de transcripción, lo que le permite activar los genes que se encuentran bajo su control y hacer que la célula avance hasta la fase S (Chellappan *et al.*, 1991; Weinberg, 1995). De esta manera, pRB permanece hiperfosforilado durante la mayor parte del ciclo celular, permitiendo que genes implicados en la división puedan ser transcritos. Finalmente, durante la salida de mitosis, pRB se va defosforilando progresivamente hasta ser defosforilado por completo al inicio de la fase G₁, lo que impide que la célula se vuelva a dividir hasta que nuevas señales fosforilen a pRb nuevamente (Dyson, 1998).

La **Figura 5** muestra cómo la fosforilación gradual de pRB produce una pérdida de afinidad de ésta por E2F-1 que es libre de unirse a los promotores de sus genes diana y guiar a la célula a la fase S.

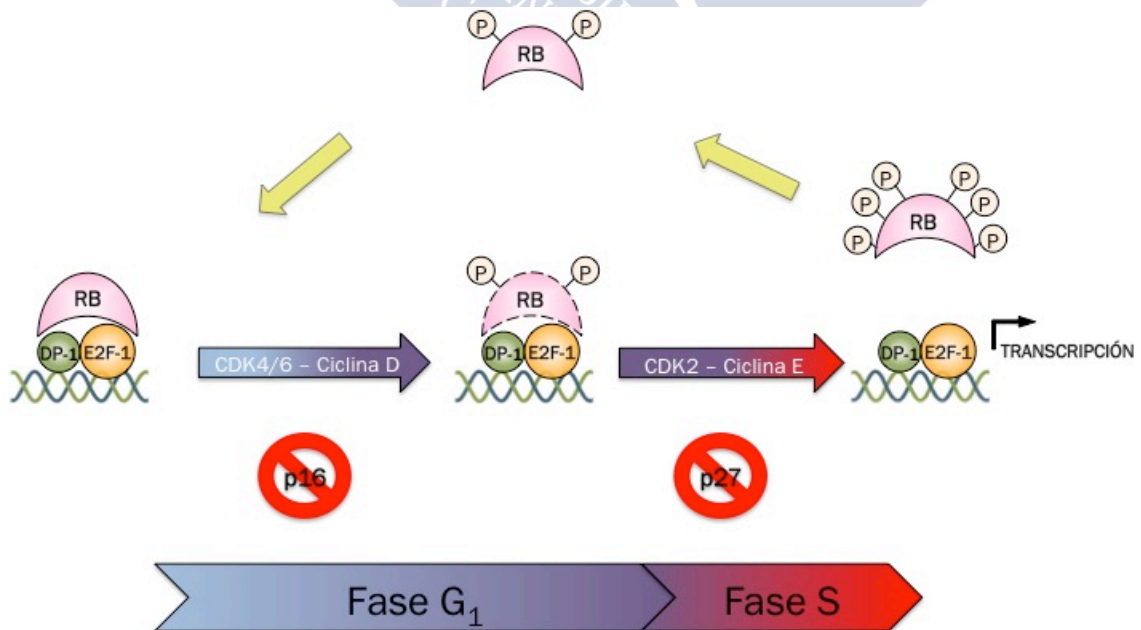


Figura 5.- Regulación de la actividad transcripcional de E2F-1 mediante la unión de pRb. La hiperfosforilación de pRb reduce su afinidad con E2F-1 y lo libera.

4. La regulación de la transcripción

Aunque tanto bacterias como eucariotas comparten muchos de los principios que regulan la transcripción genética, la complejidad en estos últimos es mayor debido al mayor número de proteínas reguladoras implicadas en el proceso. Esto implica que en eucariotas, la longitud del DNA sea mucho mayor debido a la gran cantidad de secuencias de genes y sus correspondientes regiones reguladoras, aunque la aparición de *loops* o estructuras terciarias permite a las secuencias reguladoras encontrarse a gran distancia de sus secuencias codificantes.

4.1. Los factores de transcripción

Cabe destacar, comparativamente hablando, la sencillez de la regulación de la transcripción en procariontes que sólo requiere de un único factor (factor σ) para su iniciación *in vitro*. Esto no ocurre en eucariotas puesto que son necesarias un gran número de proteínas reguladoras denominadas **factores de transcripción**. Además, la transcripción en eucariotas se ve fuertemente regulada debido al empaquetamiento del DNA en nucleosomas y otras formas más complejas de organización de la cromatina. Toda esta complejidad añadida confiere a la célula eucariota una importante ventaja, la capacidad de reunir en una misma secuencia reguladora distintas señales que darán lugar y que la maquinaria transcripcional integrará al producir el RNA mensajero (mRNA) codificado en el gen.

Las secuencias a las que estas proteínas se unen se denominan *enhancers* (potenciadores), ya que su presencia en ellas es capaz de incrementar la tasa de transcripción. En su versión más sencilla estas proteínas cuentan con dos dominios bien diferenciados, uno de unión a la secuencia específica del DNA y otro llamado de activación, con el que acelera la velocidad de transcripción. Algunas de estas proteínas se unen a uno o más de los factores de transcripción generales (p. ej. TFIID) acelerando el ensamblaje del complejo de preiniciación sobre el promotor al que se unen o mediante otros complejos como *Mediator* o la RNA polimerasa. Esto es así ya

que las GTFs, *Mediator* o la RNA polimerasa no son capaces de formar por sí mismas el complejo de transcripción en promotores empaquetados en nucleosomas sin la intervención de estas proteínas activadoras, lo que impide "fugas" en la regulación de la transcripción. Esto es favorecido no sólo por la capacidad de estas proteínas activadoras de reclutar los componentes básicos de la maquinaria transcripcional sino por su capacidad de modificar la estructura de la cromatina de las secuencias reguladoras y promotores bien mediante la modificación covalente de histonas o por la modificación y remodelación de los nucleosomas.

En el núcleo de todas las células eucariotas el DNA genómico se encuentra altamente empaquetado formando un polímero dinámico llamado cromatina. En el núcleo de la estructura de la cromatina se encuentra un grupo de histonas altamente conservadas (H3, H4, H2A, H2B y H1) que compactan el DNA formando unidades repetitivas llamadas nucleosomas y que a su vez se organizan formando las fibras de cromatina (**Figura 6**) (Luger *et al.*, 1998; Kornberg *et al.*, 1999). Los distintos niveles de organización dependen del grado de empaquetamiento de los nucleosomas, compuestos por un núcleo octamérico de histonas, un tetrámero H3-H4 y dos dímeros H2A-H2B, rodeados por 1.7 vueltas de DNA superhelicoidal (van Holde, 1988).

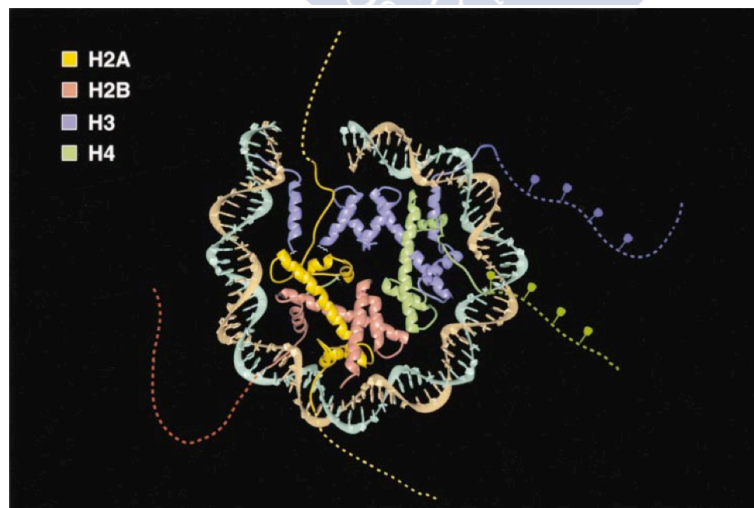


Figura 6.- Esquema del nucleosoma en el que se muestra el empaquetamiento del octámero de histonas (Adaptado de Kornberg *et al.*, 1999).

Aunque en un principio no se les concedió ningún papel relevante en la organización del DNA genómico, el papel de las histonas es reconocido como componentes fundamentales y dinámicos en la regulación transcripcional de los genes, así como de otros procesos dependientes del DNA como la replicación, reparación, recombinación y segregación cromosomal. Las histonas se componen en términos generales de un dominio globular y un extremo NH₂-terminal más flexible a modo de cola y que se encuentra en la cara exterior del nucleosoma. Estas colas son sometidas a diferentes tipos de modificaciones covalentes que a su vez controlan aspectos críticos de la estructura y función de la cromatina. Estas modificaciones localizadas de la cromatina no sólo son capaces de relajar el empaquetamiento sino que permiten la unión de otras proteínas fundamentales para la iniciación de la transcripción y que pueden incluir otras enzimas modificadoras de las histonas, complejos remodeladores de la cromatina y al menos uno de los factores generales de transcripción (GTFs). Además, estas alteraciones en la estructura de la cromatina pueden perdurar a lo largo del tiempo y de manera variable. En algunos casos como en aquellos genes que la célula "enciende" y "apaga" en respuesta a estímulos externos, estas modificaciones suelen desaparecer de inmediato al disociarse el DNA de las proteínas reguladoras, devolviendo al gen a su estado pre-activado. Sin embargo, en otros casos estas modificaciones producidas en la cromatina pueden prolongarse en el tiempo aun cuando la proteína reguladora se ha disociado del DNA transmitiéndose a la siguiente generación celular; esto mismo permitiría a la célula un mecanismo de memoria de patrones de expresión a corto y largo plazo.

4.2. *E2F-1 y ciclo celular*

Aunque la proteína E2F-1 es la más conocida y estudiada como factor positivo del ciclo celular, la familia de factores de transcripción a la que pertenece está formada por ocho proteínas (E2F-1 a -8) cuyas funciones transcripcionales son antagónicas. Estos factores E2F suelen dimerizarse con los factores DP-1 y DP-2, codificados por los genes TFDP1 y TFDP2, que permiten a las proteínas E2F unirse al DNA y ejercer su función transcripcional

(Bandara *et al.*, 1993; Helin *et al.*, 1993b). Dispuestas en la **Figura 7** se encuentran las estructuras de los principales miembros de la familia de E2F-1 y sus principales funciones biológicas, bien como activadores o represores transcripcionales (DeGregori *et al.*, 2006).

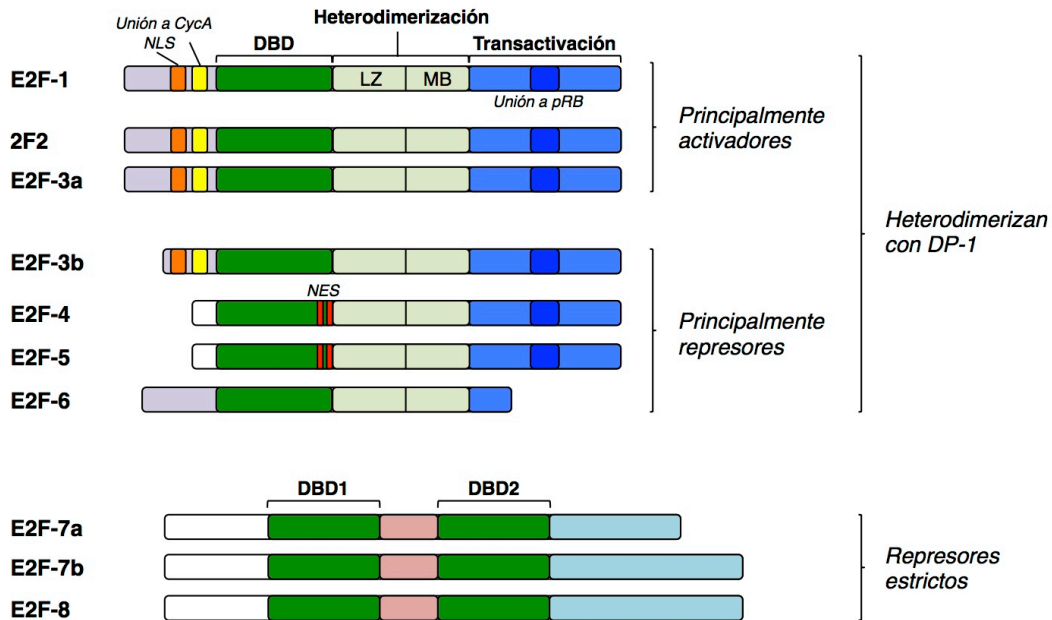


Figura 7.- Estructura y función de los miembros de la familia de E2F-1, con sus respectivos dominios, DBD (unión al DNA), heterodimerización y de transactivación. El dominio de heterodimerización está compuesto por una cremallera de leucinas (LZ) y la *marked box* (MB); NLS (señal de localización nuclear); NES, señal bipartita de exportación nuclear. Adaptado de (Chen *et al.*, 2009b).

Basándonos en su función y mecanismo transcripcional podemos clasificar a los E2F-1, -2 y -3a como los E2Fs activadores ya que son necesarios para la transactivación de genes implicados en la transición G₁/S. El estudio de los papeles específicos de cada uno de los miembros de la familia se ve obstaculizado técnicamente por el solapamiento de ciertas funciones biológicas tanto entre los E2F activadores como entre los represores lo que dificulta asignar papeles específicos a cada uno de ellos. A ello hay que sumarle el hecho de que varias de las isoformas están estrechamente relacionadas como es el caso de E2F-3a y E2F-3b, un mismo locus con promotores alternativos (Leone *et al.*, 2000), o el caso de E2F-7a y -7b codificadas por sendos *splicings* alternativos del transcrito primario (Di Stefano *et al.*, 2003). Además, la capacidad para regular la actividad transcripcional de otros miembros de la familia tiene como consecuencia circuitos

retroalimentados que complican su estudio, como se observa en el estudio de embriones de ratones doble *knock-out* de *E2f-7^{-/-}*; *E2f-8^{-/-}* que acusan una apoptosis temprana que es rescatada por la ablación de E2F-1 (Li *et al.*, 2008).

En cuanto a los tres primeros miembros, los denominados activadores transcripcionales y en especial E2F-1, el consenso general es que desempeñan un papel fundamental en la transición G₁/S. Prueba de ello la tenemos en la fluctuación de sus niveles de mRNA que alcanzan su máximo en el límite de la transición G₁/S (Kaelin *et al.*, 1992; Chittenden *et al.*, 1993; Slansky *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1994; Shan *et al.*, 1994) y que corroboran estudios en los que la delección conjunta de E2F-1, -2 y -3a ocasiona un arresto agudo del ciclo celular (Wu *et al.*, 2001). Sin embargo, estudios más recientes en los que E2F1-3 son delecionados durante el desarrollo parecen contradecir este consenso general basándose en la aparición de una pronunciada letalidad embrionaria mientras que la proliferación celular apenas se ve afectada. Estos datos indican que los E2F activadores aunque imprescindibles para la supervivencia celular no parecen serlo para su proliferación. Esta aparente contradicción puede explicarse teniendo en cuenta que en células en diferenciación los activadores E2F1-3 complejados con Rb actúan como represores más que como activadores, silenciando las dianas transcripcionales de E2F y facilitando de esta manera la salida del ciclo celular (Chong *et al.*, 2009; Chen D *et al.*, 2009). Como es de esperar la sobreexpresión de E2F-1 es suficiente estimular la proliferación y el progreso del ciclo celular hasta la fase S, además de inducir apoptosis de manera dosis dependiente, lo que demuestra el papel de E2F como mediador entre pRb y p53 (Johnson *et al.*, 1993; Shan *et al.*, 1994; Lukas *et al.*, 1996).

Por otra parte, si atendemos a los miembros reconocidos como represores, podemos diferenciarlos según su capacidad de dimerizarse con DP-1 y unirse al DNA ya que en el caso de E2F-7a, -7b y -8 esta unión no se produce. Mientras que el papel de E2F-7 y -8 no es conocido con profundidad, del resto se conocen algunas de sus dianas transcripcionales además de su papel en la regulación cíclica de los efectos pro-proliferativos de las E2F

activadoras pasada la fase S (Muller *et al.*, 1997; Gaubatz *et al.*, 1998; Cartwright *et al.*, 1998; Di Stefano *et al.*, 2003; Giangrande *et al.*, 2004; Christensen *et al.*, 2005).

4.3. *Dianas transcripcionales de E2F-1*

Los primeros estudios encargados de buscar genes regulados por la actividad de E2F-1 consistían en la búsqueda de sitios canónicos de unión de E2F en los promotores de genes inducidos en la transición G₁/S. De esta manera, se descubrió el papel que proteínas como la ciclina E1 y la fosfatasa CDC25A tienen sobre la regulación del ciclo celular, o sobre la regulación de la replicación del DNA en el caso de MCM2-7 y CDC6 (Nevins, 2001; Muller y Helin, 2000).

En años más recientes, este tipo de estudios se llevan a cabo mediante técnicas, como *microarrays* de DNA, la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) y el *ChIP-sequencing*, las cuales permiten procesar gran número de muestras e identificar cientos de candidatos potenciales. Así, no sólo se han aumentado el número de genes conocidos que son regulados por E2F-1 sino que también se han identificado genes regulados en fases del ciclo celular fuera de la transición G₁/S. De esta manera, el descubrimiento de dianas transcripcionales con capacidad de regular procesos de importancia fundamental para la mitosis como la duplicación del centrosoma, la condensación y segregación cromosomal o la formación del huso mitótico forzó a replantearse el modelo clásico de regulación transcripcional de E2F-1 (DeGregori, 2002; Steveaux y Dyson, 2002).

Sin embargo, todavía no se conoce con exactitud el mecanismo que explique el desacompasamiento de la expresión de genes cruciales en mitosis de la regulación transcripcional de la fase S. A este respecto, algunos autores proponen que la célula es capaz de alterar la longitud de la fase G₂ como respuesta a alteraciones ocurridas en G₁ por medio de las proteínas reguladas por E2F, tanto en G₁/S como en G₂/M (Reis y Edgar, 2004).

4.4. El papel de E2F-1 en desarrollo y cáncer

El estudio de ratones $Rb1^{+/-}$ y $Rb1^{-/-}$ quiméricos ha sido de gran ayuda para comprender el papel de E2F-1 durante el desarrollo embrionario. Ya que la inactivación de Rb1 conlleva la desregulación del ciclo celular y del activador E2F-1, la inactivación concomitante de E2F-1 ha puesto de manifiesto el rescate parcial de algunos de los fenotipos mutantes asociados a la pérdida de retinoblastoma. En el ratón, la inactivación de Rb produce defectos en el desarrollo del embrión que conllevan su muerte prenatal a partir del estadio E13,5, y de una mayor mortalidad en animales adultos heterocigotos por la aparición de tumores neuroendocrinos a causa de un fenómeno de pérdida de heterocigosidad (Jacks *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 2003). Cuando la deficiencia de retinoblastoma se combina con la de E2F-1 en el doble knock-out $E2f-1^{-/-} Rb^{-/-}$ la letalidad embrionaria se retrasa hasta el estadio E17,0, además de suprimir la apoptosis debida a la hiperactivación de E2F-1 y extender la esperanza de vida en individuos $E2f-1^{-/-} Rb^{+/-}$ (Tsai *et al.*, 1998; Yamasaki *et al.*, 1998).

De manera análoga, la delección de $E2f-3$ en ratones $Rb^{-/-}$ dio como resultado la supresión de los adenomas pituitarios pero un aumento de metástasis en tumores medulares tiroideos, lo que al igual que E2F-1, sugiere que E2F-3 puede comportarse bien como oncogén o como supresor de tumores dependiendo del tejido (Ziebold *et al.*, 2003; Chong *et al.*, 2009). Esta dualidad en el comportamiento de los factores de transcripción E2F choca con la preconcepción de que los E2F activadores tienden a comportarse como oncogenes, y a su vez los represores como supresores de tumores. Un buen ejemplo de ello es la aparición de linfomas o tumores de origen mesenquimal en ratones $E2f-1^{-/-}$, y teniendo en cuenta que la pérdida de $Rb1$ no induce linfomagénesis sugiere que este posible efecto supresor de tumores de E2F-1 se produce de manera independiente de retinoblastoma (Yamasaki *et al.*, 1996; Field *et al.*, 1996). Además, y como se desprende del análisis de las alteraciones genéticas más frecuentes de estos genes en múltiples tejidos tumorales, los activadores como E2F-1 pueden aparecer amplificados, con

incrementos en su expresión pero también en algunos casos como en adenocarcinomas gástricos, de colon o vejiga con una expresión reducida (Chen *et al.*, 2009a; Chen *et al.*, 2009b).

4.5. *Modulación de la actividad transcripcional de E2F-1 independiente de pRB*

La actividad transcripcional de E2F-1 no sólo es modulada por la ya comentada unión con Rb, ya que otras proteínas no sólo son capaces de unirse sino que pueden modificar de manera positiva (co-activadores) o negativa (co-represores) la actividad de E2F-1. Dentro de este grupo de cofactores transcripcionales el ejemplo más popular de co-activador quizás sea el de las proteínas DP-1 y DP-2 que ya fue mencionado previamente. La asociación de E2F-1 y DP-1 produce una activación cooperativa de su actividad transcripcional y además es una condición necesaria para una interacción estable con pRB *in vivo* (Helin *et al.*, 1993b). Además, el estudio de ratones knock-out revela que la presencia de DP-1 es necesaria durante el desarrollo embrionario, en especial en el desarrollo de tejidos derivados del trofoectodermo (Kohn *et al.*, 2003), aunque en el caso de ratones quiméricos este requerimiento parece limitarse únicamente al desarrollo extraembrionario (Kohn *et al.*, 2004).

En cuanto a co-represores transcripcionales un caso interesante es el de la proteína TopBP1 (*DNA topoisomerase II β binding protein*) la cual interviene en la detección del daño al DNA, como demuestra su presencia en macrocomplejos junto a BRCA1 o 53BP1 en *foci* producidos por radiación ionizante, o en la inducción de apoptosis tras la inhibición de su expresión con oligómeros antisentido (Mäkiniemi *et al.*, 2001; Yamane *et al.*, 2002). TopBP1 interacciona con E2F-1 por medio de la unión de uno de sus ocho dominios BRCT con el extremo N-terminal del factor de transcripción, en concreto con el residuo Ser31 que es fosforilado por la quinasa ATM durante la detección del daño al DNA. En este escenario, la actividad transcripcional de E2F-1 es suprimida por la unión con TopBP1 y E2F-1 es reclutado a los lugares donde

se ha producido el daño al DNA (Liu *et al.*, 2003). Curiosamente, esta unión es específica de E2F-1 y no se ha visto reproducida con ninguno de los otros miembros de la familia, lo que convierte a TopBP1 en un regulador específico de E2F-1. Otra proteína implicada en la reparación del DNA como PARP-1 parece tener un papel opuesto al de TopBP1 ya que su interacción con E2F-1 co-activa la actividad de E2F-1 durante la transición G₁/S, específicamente en proteínas como PCNA o DNA polimerasa α implicados en etapas tempranas de la fase de síntesis del DNA (Simbulan-Rosenthal *et al.*, 1999). Curiosamente, la interacción física entre ambas proteínas parece tener lugar al igual que en el caso de TopBP1, por medio del dominio BRCT de PARP-1 (Simbulan-Rosenthal *et al.*, 2003). A continuación, hablaremos más en profundidad de esta proteína y de sus peculiaridades estructurales y enzimáticas.

5. La familia de las poli-(ADP-ribosa) polimerasas

Dentro de las modificaciones post-traduccionales, la poli-ADP-ribosilación de histonas y otras proteínas nucleares surgen como respuesta inmediata al daño al DNA ya que tiene como objetivo asegurar la supervivencia y proliferación de la célula dañada. Las enzimas que catalizan esta reacción son conocidas como las poli-ADP-ribosa polimerasas (PARPs), también llamadas ADP-ribosa transferasas (ARTDs) (Hottiger *et al.*, 2010). Su mecanismo de acción se basa en la reducción de la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) para catalizar la transferencia del grupo ADP-ribosilo sobre residuos aminoacídicos, sobre otras ADP-ribosas con el objetivo de formar polímeros, nucleótidos y otras moléculas con propiedades antibióticas (de Murcia *et al.*, 1994; D'Amours *et al.*, 1999).

Dentro de esta familia, PARP-1 (EC 2.4.2.30) es con diferencia el miembro mejor estudiado de su propia familia (Amé *et al.*, 2004; Hassa *et al.*, 2008). Su estructura está bien caracterizada y se compone de 1014 aminoácidos dispuestos en seis dominios diferenciados de los que cuatro han

sido caracterizados funcionalmente (**Figura 8**). El primer dominio (DBD) se encarga de la unión de la proteína al DNA y por ello contiene dos motivos 'zinc-finger' en su extremo N-terminal y que guardan similitudes con los encontrados en la DNA ligasa III y la 3' DNA fosfoesterasa de *Arabidopsis thaliana* (Petrucco *et al.*, 2002). El siguiente dominio contiene un señal de localización nuclear (NLS) y una diana proteolítica de la caspasa-3, cuyo patrón de corte es característico de la entrada en apoptosis de la célula (Kaufmann *et al.*, 1993). El dominio central se denomina de automodificación (residuos 373-524) y contiene un motivo BRCT (*BRCA1 C Terminus*), presente en muchas otras proteínas y que sirve como interfaz de interacción en uniones proteína-proteína, principalmente con proteínas implicadas en funciones de control de ciclo celular moduladas por el daño al DNA. Por último, el dominio C-terminal (residuos 796-1014) es el responsable de la actividad enzimática de la proteína. Otros miembros de la familia presentan una mayor variedad de dominios y motivos con funciones distintas, como la interacción con ubiquitinas (UIM), con proteínas implicadas en la organización cromosómica (SAP), RNA (RRM) e incluso hormonas, lo que redundará en sus respectivas funciones biológicas (Amé *et al.*, 2004).

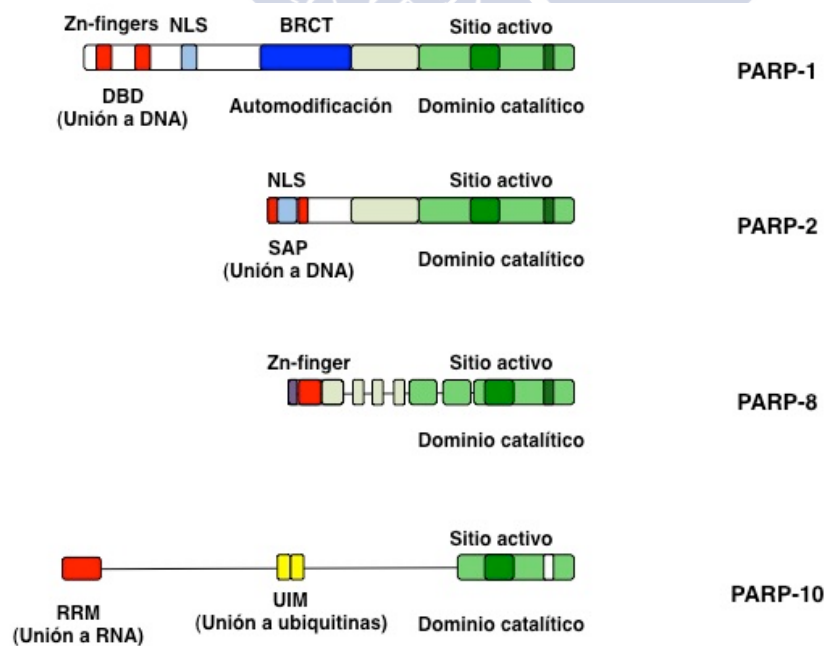


Figura 8.- Algunos de los miembros más relevantes de la familia de poli(ADP-ribosa) polimerasas a la que pertenece PARP-1 (Adaptado de Amé *et al.*, 2004).

5.1. Análisis estructural de PARP-1

Aunque la mayor parte de los miembros de la familia de PARP-1 presentan la característica actividad enzimática dependiente de NAD⁺, como refleja su alta homología en el extremo C-terminal, no es infrecuente que difieran en el extremo N-terminal que es donde se ubican los dominios responsables de la unión al DNA y de localización subcelular. En el caso de PARP-1, tras la unión a un extremo de DNA la activación de PARP-1 se produce mediante modificaciones alostéricas con el fin de ejercer sus funciones biológicas sobre diversos procesos nucleares (Cherney *et al.*, 1987; Menissier-de Murcia *et al.*, 1989). PARP-1, además presenta la capacidad de autopoli-ADP-ribosilarse en el dominio central o de automodificación (Kawaichi *et al.*, 1981; Cherney *et al.*, 1987), mientras que otros miembros como PARP-2 o PARP-3 suelen encargarse de la actividad poli-ADP-ribosil polimerasa en células deficientes de PARP-1 (Shieh *et al.*, 1998; Amé *et al.*, 1999). Además, las funciones de estas PARPs suelen estar relacionadas con un amplio abanico de procesos celulares que no sólo incluyen la reparación del DNA sino también la transcripción, señalización celular, la regulación del ciclo y la mitosis (Amé *et al.*, 2004; Hakmé *et al.*, 2008; Hassa y Hottiger, 2008; Schreiber *et al.*, 2006).

En cuanto a la localización de las poli (ADP-ribosa) polimerasas se ha descrito su presencia en muy diversos compartimentos tales como el núcleo, citoplasma, mitocondrias y otras organelas, aunque la localización de algunos miembros de esta familia no se ha caracterizado con exactitud. En el núcleo se hallan principalmente las PARP-1, -2, -3, y PARP-5a y -5b (Tanquirasas 1 y 2), además de v-PARP (PARP-4), PARP-6, -8, -9, las proteínas Bal 1-3 (PARP -13, -14, -15) y PARP-10, aunque de manera no exclusiva ya que se pueden encontrar en otras localizaciones subcelulares (Amé *et al.*, 2004; Hakmé *et al.*, 2008; Hassa y Hottiger, 2008; Schreiber *et al.*, 2006).

Los procesos nucleares que implican el acceso o la modificación del genoma, tales como la transcripción y la reparación del DNA, requieren de

proteínas reguladoras y otras con funciones estructurales. De la poli(ADP-ribosa) polimerasa PARP-1 se conocen distintas actividades bioquímicas y su presencia en la célula es ubicua y en gran abundancia (D'Amours, 1999), lo que la convierte en una candidata ideal para desempeñar multitud de funciones estructurales y de regulación a través del genoma (Hassa y Hottiger, 2008; Kim *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2004; Schreiber *et al.*, 2006). Como ya se ha mencionado, PARP-1 posee un dominio dotado de Zn-fingers que le permite unirse a regiones específicas del genoma y nucleosomas sobre los que ejercer su actividad catalítica, sintetizando polímeros cargados negativamente denominados PAR (poli ADP-ribosa) unidos a las proteínas objetivo. La síntesis de este homopolímero es dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) y es formado por unidades de ADP-ribosa unidas por enlaces glicosídicos (Chambon *et al.*, 1963; Chambon *et al.*, 1966; Reeder *et al.*, 1967) tal y como se puede ver en la **Figura 9**.

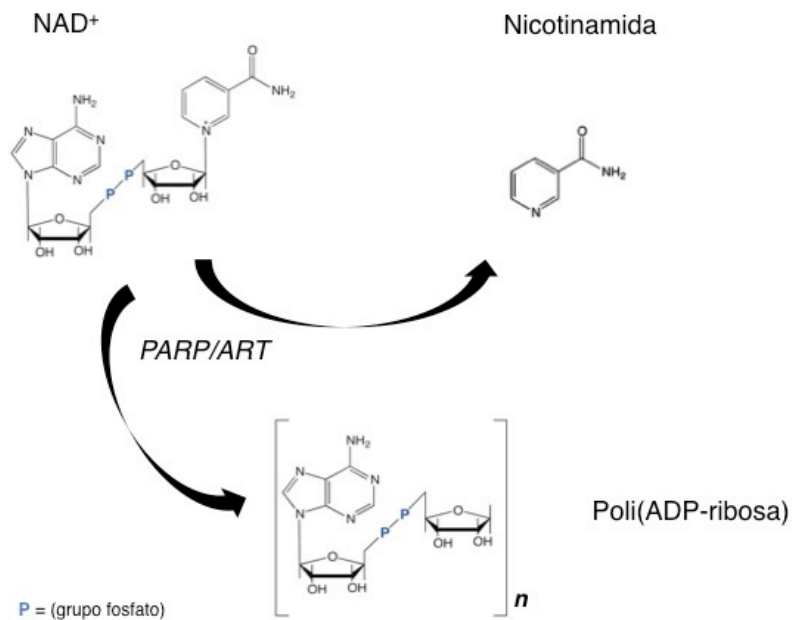


Figura 9.- Reacción catalizada por un miembro de la familia de PARP-1 donde se procesa una unidad de NAD^+ para dar nicotinamida y el homopolímero de poli(ADP-ribosa).

El sitio catalítico de PARP-1 es capaz de llevar a cabo distintas reacciones de síntesis de unidades de PAR: la primera, la iniciación o unión de la ADP-ribosa a una proteína aceptora, la segunda, elongación y por último la

ramificación del polímero o *branching*. La unión de las unidades de PAR a las proteínas se produce con una alta probabilidad en residuos de ácido glutámico y aspártico formando un enlace éster en el proceso. El polímero suele ramificarse cada 20 ó 50 unidades de ADP-ribosa y la longitud y complejidad final del polímero viene determinada por el grado de actividad de la enzima (Alvarez-Gonzalez *et al.*, 1999). En cualquiera de las reacciones catalizadas por PARP-1, o por cualquier otra PARP, el dinucleótido nicotinamida (NAD⁺) es usado como sustrato. Como resultado, las unidades lineales de poli(ADP-ribosa) o PAR se unen unas a otras mediante enlaces glicosídicos ribosa-ribosa 1"→2' formando el polímero sobre los residuos de las proteínas modificadas. Como subproducto de la catálisis, también se produce el mononucleótido nicotinamida (NAM). Los enlaces glicosídicos 1"→2' pueden ser hidrolizados mediante poli(ADP-ribosa) glicosidasas o PARGs (Chambon *et al.*, 1963; Amé *et al.*, 2004).

Las proteínas PARiladas, o las que se sospecha que pueden serlo, incluyen histonas, factores de transcripción, enzimas nucleares y proteínas estructurales del núcleo. En cuanto a las histonas, PARP-1 PARila específicamente a H1, H2A y H2B, las cuales juegan un papel en la regulación de las propiedades estructurales de la cromatina, y por tanto de la transcripción, aunque el alcance y relevancia de esta regulación todavía no se conoce al detalle (D'Amours *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2005; Kraus y Lis, 2003; Kraus *et al.*, 2008). De manera previsible, PARP-1 también es capaz de PARilar a proteínas implicadas en la reparación del DNA, incluyendo a p53 del que se sospecha esta modificación en varios lugares específicos como Glu255, Asp256 y Glu268 puede modificar su localización intracelular (Mendoza-Alvarez *et al.*, 2001; Kanai *et al.*, 2007).

5.2. Funciones en el núcleo: reparación y mantenimiento del genoma

Aunque la reparación del daño en el DNA es la función de PARP-1 más reconocida no es ni mucho menos la única, ya que desempeña una serie de contribuciones singulares a la biología molecular de los procesos nucleares,

interviniendo en el mantenimiento de la integridad genómica, la regulación de la estructura de la cromatina, en la transcripción de genes y en el mantenimiento de los patrones de metilación, entre otras (Hassa y Hottiger, 2008; Kim *et al.*, 2005).

5.2.1. Reparación del DNA

Según el consenso general, la PARilación tiene lugar inmediatamente tras el daño al DNA, modificando la estructura de la cromatina y la liberación de histonas específicas debido a repulsiones electrostáticas producidas por los polímeros de PAR (Juarez-Salinas *et al.*, 1979; Benjamin *et al.*, 1980; Durkacz *et al.*, 1980; Smith *et al.*, 2001; Messner *et al.*; 2010). Tras la detección del daño en el DNA, PARP-1 se activa uniéndose a roturas de cadena simple donde ayuda a reclutar a otros factores implicados en el mecanismo de reparación por escisión de base (BER). Algunos de estos factores como en el caso de XCC-1 interaccionan y son PARilados por PARP-1, condición que parece necesaria para su activación y reclutamiento en el lugar donde se ha producido el daño (El-Khamisy *et al.*, 2003; Heale *et al.*, 2006; Masson *et al.*, 1998; Okano *et al.*, 2003). Aunque de otras proteínas como en el caso de la DNA ligasa III, también implicadas en BER, se ha descrito su capacidad para ser PARiladas por PARP-1 todavía no se conoce con profundidad las implicaciones biológicas de esta interacción (Pleschke *et al.*, 2000). Sin embargo, BER no es el único mecanismo en el que PARP-1 participa ya que se conoce su interacción y reclutamiento de otras proteínas que regulan la reparación de roturas de doble cadena por unión de extremos no homólogos (NHEJ) y por recombinación homóloga (Audebert *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006; Haince *et al.*, 2008; Woodhouse y Dianov, 2008). De igual manera, se ha demostrado la implicación del segundo miembro de la familia PARP-2 en rutas de reparación del DNA implicadas en reparación por escisión de base BER (Schreiber *et al.*, 2002; Yélamos *et al.*, 2008).

Hasta el momento, tres grupos diferentes han generado ratones deficientes de la proteína PARP-1 de manera independiente, y que en todos

los casos los ratones fueron viables, fértiles y con hipersensibilidad a agentes genotóxicos y radiación ionizante (Wang *et al.*, 1995; de Murcia *et al.*, 1997; Masutani *et al.*, 1999). Aunque los estudios con ratones *knock-out* de *Parp1*^{-/-} y *Parp2*^{-/-} indican que ninguno de los dos resulta indispensable para el desarrollo del embrión o implica una merma en su esperanza de vida, no es el caso del doble *knock-out* *Parp1*^{-/-} *Parp2*^{-/-} que no sólo presenta letalidad embrionaria, sino que agrava la inestabilidad cromosómica que en los *knock-outs* simples no tiene consecuencias fatales para el ratón (Menissier de Murcia *et al.*, 2003). Asimismo, ambas proteínas cooperan para detectar horquillas de replicación defectuosas, reclutan a otras proteínas implicadas en la reparación como Mre11 y reinician la replicación (Bryant *et al.*, 2009). Al igual que otros tipos de estrés celular, el daño producido en el DNA activa de manera inmediata la actividad catalítica de PARP-1 sobre una serie de proteínas nucleares. La intensidad de esta respuesta puede variar dependiendo del grado y la ruta de reparación activada en cada caso, en el caso de que el daño en el DNA sea de baja intensidad, PARP-1 promueve la supervivencia celular y reparación del DNA. Si el daño resulta más severo, PARP-1 promueve la muerte celular por medio de dos rutas diferentes, la primera por una pérdida de NAD⁺ y, por extensión, de ATP privando a la célula de sus reservas energéticas. La segunda, por medio de apoptosis inducida por factores pro-apoptóticos (Bouchard *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005).

Como es de esperar, PARP-1 interacciona física y funcionalmente con otras proteínas implicadas en la respuesta al daño en el DNA como es el caso de la quinasa ATM o el supresor de tumores p53. En consecuencia, las células carentes de PARP-1 muestran una activación deficiente de ATM y una capacidad reducida para formar focos de H2AX_g, indicativos de daño al DNA (Menissier de Murcia *et al.*, 2001; Aguilar-Quesada *et al.*, 2007).

5.2.2. Mitosis

Uno de los procesos de importancia crítica durante el ciclo celular tiene lugar durante la mitosis, en la que se produce la segregación de las

cromátidas hermanas dando lugar a dos células hijas con una dotación $2n$ cada una. La inactivación de los mecanismos de regulación que guían los procesos de duplicación del DNA y ensamblaje del huso mitótico, habituales en el proceso oncogénico, resulta en la hiperamplificación de los centrosomas y en una citocinesis defectuosa característica de células cancerosas (Pihan *et al.*, 1998; Carroll *et al.*, 1999). Curiosamente, varios autores han descrito la localización de PARP-1 en el centrosoma durante la mitosis y la interacción y PARilación de diversas proteínas implicadas en la organización de la cromatina pericéntrica y división celular como CENP-A, CENP-B, Bub3 y Aurora B. En este contexto, la PARilación de estas proteínas vendría producida por daño en el DNA producido por las fuerzas de tensión entre las dos células hijas que experimentan una segregación de cromátidas desequilibrada (Kanai *et al.*, 2000; Earle *et al.*, 2000; Saxena *et al.*, 2002a; Saxena *et al.*, 2002b; Kanai *et al.*, 2003; Monaco *et al.*, 2005).

Asimismo, unos niveles bajos de proteínas PARiladas como consecuencia de una haploinsuficiencia o delección de PARP-1 se correlacionan con una hiperamplificación de los centrosomas lo que resalta la importancia de la actividad enzimática de PARP-1 en la duplicación centrosómica (Kanai *et al.*, 2007). Además, la inhibición de la PARilación con poli(ADP-ribosa) glicohidrolasas (PARGs) no bloquea la formación del huso mitótico sino que produce monopolos no funcionales que impiden la formación del huso bipolar, lo cual sugiere un papel crítico de la poli(ADP-ribosa) en la estabilización de interacciones antiparalelas de los microtúbulos en el huso central (Chang *et al.*, 2004). También se han descrito a otros miembros de la familia como PARP-3, PARP-4 y las tanquirasas 1 y 2, colaborando con PARP-1 en el control del aparato mitótico, incluyendo los centrómeros, centrosomas y husos mitóticos (Kim *et al.*, 2005).

5.2.3. Regulación transcripcional modulada por PARP-1

Un síntoma claro de los distintos papeles que juega PARP-1 en la regulación transcripcional de la célula es la presencia de esta proteína en

complejos multiproteicos de replicación del DNA como MRC o el DNA sintesoma. El papel de PARP-1, sin embargo, no se limita a su simple presencia sino que es capaz de modificar su composición y regular las actividades enzimáticas de estos macrocomplejos (Simbulan-Rosenthal *et al.*, 1998). La literatura disponible sobre el papel de PARP-1 en la regulación de la transcripción sugiere al menos cuatro mecanismos mutuamente no exclusivos. El primero de estos mecanismos, que ya fue mencionado brevemente más arriba, está relacionado con la capacidad de PARP-1 de PARilar las histonas con el objetivo de alterar la estructura de la cromatina. El segundo de los mecanismos consiste en la función de PARP-1 como un co-regulador clásico con una amplia variedad de activadores transcripcionales unidos a secuencias específicas en el DNA. Un tercer mecanismo de regulación sería como factor unido directamente a secuencias potenciadoras (*enhancers*) y como cuarto y último mecanismo, regulando la actividad de los aisladores y de los factores unidos a aisladores como CTCF (Kim *et al.*, 2005; Kraus *et al.*, 2008).

- *Alteración de la estructura de la cromatina*

Como vimos más arriba, PARP-1 es capaz de unir polímeros de PAR a componentes del nucleosoma para modificar la estructura de la cromatina (D'Amours *et al.*, 1999). Estos componentes nucleosomales las histonas H1 y H2B son con diferencia, aunque no de manera exclusiva, las dianas preferidas de PARP-1 en estudios *in vitro*. Una de las consecuencias más notables de la PARilación del nucleosoma es la descondensación, imitando los efectos de la pérdida de la histona H1 del complejo (Poirier *et al.*, 1982; Huletsky *et al.*, 1989). Por otra parte, los monómeros de PAR, bien unidos a proteínas sustrato o como polianiones libres, pueden arrastrar a histonas liberadas de nucleosomas descondensados, exponiendo aún más al DNA y dejando así vía libre a la maquinaria transcripcional de la célula. Aunque la longitud de los polímeros en zonas del genoma PARiladas por señales transcripcionales es sensiblemente inferior a la de zonas afectadas por daño al DNA, su densidad y tamaño puede ser suficiente para producir esta descondensación de la cromatina. Este efecto sin duda puede amplificarse con la PARilación conjunta

de otras proteínas cromosómicas aparte de las histonas como por ejemplo proteínas estructurales como HMGB1 o factores de transcripción (Mathis y Althaus, 1987; Realini y Althaus, 1992; Ju *et al.*, 2006). Estudios más recientes demuestran que en ausencia de NAD⁺ o de autoPARilación significativa PARP-1 es capaz de reclutar nucleosomas cercanos aumentando el grado de condensación de la cromatina. Por el contrario, con niveles de saturación de NAD⁺, y por tanto una alta proporción de PARP-1 automodificado, la compactación se revierte casi por completo (Kim *et al.*, 2004; Wacker *et al.*, 2007).

Cabe destacar de nuevo la capacidad de PARP-1 para regular la composición de la cromatina. Por ejemplo, la presencia de PARP-1 parece bloquear la unión de la histona H1, una proteína estructural relacionada con la represión transcripcional, a los promotores de la cromatina (Krishnakumar *et al.*, 2008). Además, la PARilación de DEK, un componente abundante y ubicuo de la cromatina, produce su liberación de la cromatina a la vez que promueve la unión del complejo co-regulador *Mediator* y la potenciación de la transcripción (Gamble *et al.*, 2007).

- Co-regulación transcripcional de PARP-1

Además de alterando el grado de condensación de la cromatina, PARP-1 puede regular la transcripción alterando la actividad de potenciadores y promotores (D'Amours *et al.*, 1999; Hassa y Hottiger, 2002). Existe gran número de estudios que recogen la intervención de PARP-1 como co-regulador (co-activador o co-represor) de promotores específicos de manera conjunta con otras proteínas. Estas proteínas pueden ser reguladores transcripcionales como NF- κ B, y receptores nucleares como HES1, B-Myb, Oct-1, HTLV Tax-1, Sp1, NFAT, Elk1, entre otros (Kim *et al.*, 2005; Kraus, 2003; Ju *et al.*, 2004; Pavri *et al.*, 2005; Hassa y Hottiger, 2002; Olabisi *et al.*, 2008; Zaniolo *et al.*, 2007; Cohen-Armon *et al.*, 2007). También es preciso tener en cuenta el efecto que PARP-1 puede tener sobre los complejos de transcripción ensamblados en los promotores diana, ya que puede liberar de estos complejos factores inhibitorios o reclutar otros que estimulen la

transcripción actuando de esta manera como un factor de reemplazo (Ju *et al.*, 2004; Pavri *et al.*, 2005; Ju *et al.*, 2006).

- *Unión de PARP-1 a potenciadores*

Muchos de los primeros estudios que describieron un efecto directo de PARP-1 sobre la transcripción se centraron en la unión de éste a secuencias específicas o estructuras de las regiones reguladoras de genes, permitiendo a PARP-1 funcionar como un factor unido a potenciador clásico (Butler *et al.*, 1999; Akiyama *et al.*, 2001; Nirodi *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2004). Otros ejemplos de genes afectados por esta unión de PARP-1 a sus secuencias reguladoras son CXCL1 y BCL6, e incluso la unión directa de PARP-1 a estructuras secundarias del DNA puede ser parte de algún mecanismo autorregulatorio de la expresión del propio gen de PARP-1 (Soldatenkov *et al.*, 2002; Amiri *et al.*, 2006; Ambrose *et al.*, 2007).

- *PARP-1 como aislante transcripcional*

Los aislantes son elementos del DNA que lo separan en unidades reguladoras discretas al limitar los efectos de los potenciadores dentro de los promotores o bien previniendo la expansión de la heterocromatina (Wallace *et al.*, 2007). Una de las proteínas más activas en estas secuencias genómicas es CTCF, la cual es PARilada por PARP-1 y cuya inhibición bloquea la función de los aislantes a los que se une CTCF (Yu *et al.*, 2004; Yusufzai *et al.*, 2004; Klenova *et al.*, 2005). La actividad de PARP-1 sobre estos aislantes puede estar también relacionada con la matriz nuclear y metilación del DNA, fenómenos estrechamente relacionados con la función de estas secuencias. De hecho, PARP-1 es capaz de regular la metilación de secuencias genómicas mediante la regulación de la DNA metiltransferasa DNMT1, modulando de paso la unión de CTCF a los aislantes (Althaus *et al.*, 2005; Zardo *et al.*, 2003; Reale *et al.*, 2005; Bell *et al.*, 2000).

5.3. *Inhibidores de PARP-1*

La importancia de la actividad catalítica de al menos PARP-1 en el

proceso de reparación del genoma convierte el desarrollo de moléculas capaces de inhibir esta actividad en un objetivo farmacológico como potenciadores de otros agentes capaces de inducir daño al ADN (Durkacz *et al.*, 1980). Esta capacidad de los inhibidores de PARP de potenciar el efecto de quimioterápicos como la temozolomida (TMZ) ha sido objeto de estudio con resultados prometedores (Delaney *et al.*, 2000; Plummer *et al.*, 2006).

Sin embargo, el rango de aplicación de estos inhibidores no se limita exclusivamente a su efecto quimiopotenciador sino que también han sido ensayados en monoterapias en tumores que presentan una deficiencia de BRCA-1 y/o BRCA-2 como es el caso de algunos adenocarcinomas de mama y ovario. En estos casos, la deficiencia de BRCA-1 y/o BRCA-2 conlleva graves deficiencias en el mecanismo de reparación homóloga, concretamente en la formación de focos dependientes de Rad51 (Bhattacharyya *et al.*, 2000). Así, la inhibición de PARP en ausencia BRCA-2 provoca un arresto en G₂/M seguida de la aparición de roturas y aberraciones cromosómicas además de un fuerte aumento de la apoptosis, lo que sugiere una deficiencia crítica en el mecanismo de reparación de roturas de doble cadena. Además, estos defectos severos en la reparación por recombinación homóloga hacen altamente vulnerables a este tipo de tumores cuando son tratados con agentes capaces de interrumpir o colapsar las horquillas de replicación en comparación a células que portan copias funcionales de las BRCA (Farmer *et al.*, 2005; Bryant *et al.*, 2005).

Esta letalidad sintética puede darse de igual manera con la inhibición de PARP en células sensibilizadas como consecuencia de la mutación de proteínas implicadas en la recombinación homóloga como XRCC3, o la delección de supresores de tumores como PTEN que tiene como consecuencia inestabilidad genómica (Mendes-Pereira *et al.*, 2009; Drew *et al.*, 2011). Asimismo, la inhibición de CDK1 puede tener un efecto similar dado que la fosforilación de BRCA1 por parte de esta quinasa dependiente de ciclina es de vital importancia para el mecanismo de recombinación homóloga (Johnson *et al.*, 2009). La inhibición parcial de CDK1 conduce a células con BRCA intacto a

un estado similar al de sus contrapartidas con mutaciones o ausencia de BRCA compartiendo algunos rasgos característicos de estos tumores como la capacidad reducida de formar focos en respuesta al daño al DNA (Turner *et al.*, 2004; McCabe *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2011).

Todo esto sugiere un gran potencial terapéutico para los inhibidores de PARP en células con mutaciones de BRCA, u otras proteínas, y células con BRCA intacto sensibilizadas mediante el tratamiento con inhibidores de CDK1. La **Figura 10** muestra un esquema de las diferentes combinaciones y su resultado biológico.

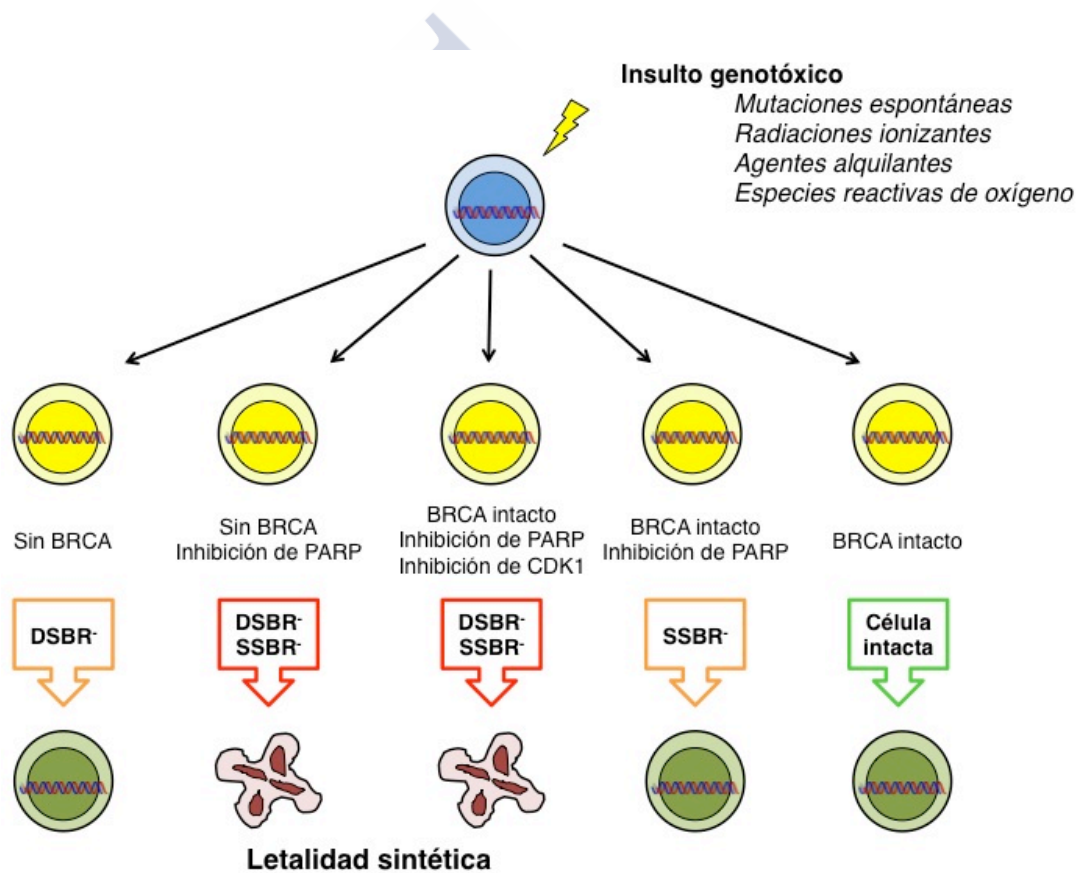


Figura 10.- Letalidad sintética en tumores en los que la inhibición de PARP es coincidente con la deficiencia de BRCA. La inhibición de CDK1 puede sensibilizar células con BRCA intacto.

5.3.1. Desarrollo y aplicaciones de los inhibidores de PARP.

La posibilidad de contar con inhibidores específicos de la actividad enzimática de PARP no sería interesante solamente por su aplicabilidad en terapias sino que también contribuiría a la descripción e investigación de las

bases de mecanismos moleculares en los que PARP esté implicado. Gracias a los numerosos estudios centrados en la estructura del dominio catalítico de PARP se sabe que es lo suficientemente grande como para acomodar dos lugares de unión diferentes denominados el sitio aceptor y sitio donante (Ruf *et al.*, 1996). El sitio donante es ocupado por la nicotinamida que se añadirá en primer lugar a un residuo glutamato de la proteína sustrato en la reacción de iniciación que a su vez ocupará el sitio aceptor en el inicio de la reacción y posteriormente la cadena de ADP-ribosa en la elongación. El sitio de unión de la nicotinamida está dividido a su vez en tres subregiones, denominados los sitios de unión de la nicotinamida-ribosa (NI), del fosfato (PH) y de la adenina-ribosa (AD) (Kinoshita *et al.*, 2004).

Una de las primeras moléculas conocidas capaces de inhibir la PARilación fue la nicotinamida, que como hemos explicado anteriormente es un subproducto de la reacción de catálisis del NAD⁺ mediada por PARP. Aunque se considera un inhibidor muy débil, la nicotinamida puede ocupar el lugar de unión del sustrato de manera suficiente como para reducir la actividad catalítica de PARP. La benzamida, estructuralmente próxima a la nicotinamida, también es capaz de inhibir la actividad de PARP y al carecer del nitrógeno heterocíclico presente en la nicotinamida no es metabolizada por enzimas implicadas en la biosíntesis del NAD⁺. Aunque presenta una baja solubilidad en agua ésta puede ser mejorada con la sustitución en la posición 3 con grupos polares dando lugar a una serie de análogos con interesantes propiedades. Un buen ejemplo de estos derivados de la benzamida es la 3-aminobenzamida (3-AB), capaz de inhibir la PARilación con dosis inferiores a 2 μ M (Shall, 1975). Sin embargo, la actividad inespecífica de la 3-aminobenzamida, especialmente en procesos metabólicos como la síntesis *de novo* de purinas, ha puesto en entredicho tanto su idoneidad como inhibidor de referencia así como los datos obtenidos con este tipo de compuestos (Milam *et al.*, 1984; Moses *et al.*, 1988; Moses *et al.*, 1990).

La necesidad de una mejor especificidad derivó en el desarrollo de una nueva generación de inhibidores. Con este propósito, se llevaron a cabo

diversas iniciativas que combinaron estudios de relación estructura-actividad (SAR) con librerías de compuestos y desarrollo de nuevas moléculas basándose en datos estructurales obtenidos por cristalografía (Suto *et al.*, 1991; Banasik *et al.*, 1992). De estos estudios surgieron nuevos inhibidores estructuralmente análogos a la benzamida como DPQ (3,4-dihidro-5-[4-(1-piperidinil)butoxil]-1(2H)-isoquinolinona) o NU1025 (8-hidroxi-2-metilquinazolin-4-[3H]-ona), con capacidades inhibitorias muy superiores a la de la 3-aminobenzamida (Griffin *et al.*, 1995). El descubrimiento de estos nuevos inhibidores puso de manifiesto ciertas características estructurales que finalmente resultaron de gran importancia en el análisis de la actividad biológica de estos compuestos. Primero, la presencia de un grupo carbamoilo en posición *anti* con respecto al enlace 2,3 del heterociclo facilita la formación de enlaces de hidrógeno con los residuos del *pocket* de la nicotinamida, especialmente con la glicina 863 y la serina 904 (**Figura 11a**) (Ruf *et al.*, 1996; Rolli *et al.*, 1997; Canan-Koch *et al.*; 2002). En segundo lugar, la afinidad del grupo carbamoilo al dominio de unión a NAD⁺ es mejorada de manera considerable por la presencia de un sistema aromático adyacente rico en electrones y un enlace no escindible en la posición 3 (**Figura 11b**) (Suto *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1992).

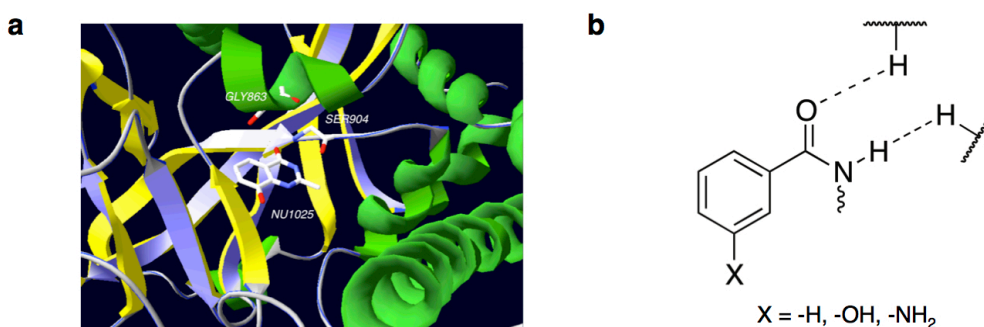


Figura 11.- **a**, estructura del centro catalítico de PARP-1 unido al inhibidor NU1025 (PDB ID: 4PAX) en el que se destaca la posición de los aminoácidos Gly863 y Ser904; **b**, resumen de las características estructurales de los inhibidores de PARP-1 basados en análogos de la benzamida. En líneas discontinuas se resaltan los puentes de hidrógeno.

A día de hoy, la eficacia de nuevas moléculas con propiedades inhibitorias de PARP-1 ha sido puesta a prueba en multitud de ensayos clínicos tanto como monoterapia como en tratamientos combinados en

diversos tipos de tumores (Yélamos *et al.*, 2011; O'Sullivan *et al.*, 2014). En la **Tabla 1** se muestra una lista de inhibidores de PARP-1 de última generación con fases clínicas completadas o todavía en desarrollo.

Molécula	Compañía	Vía de administración	Tipo de tumor	Estudios
AG014699 (Rucaparib)	Pfizer	Multiterapia con TMZ (i.v.)	Mama y ovario, tumores sólidos	Empezando los primeros estudios Fase III
Olaparib (AZD2281/ KU0059436)	Astra Zeneca/ KuDOS	Monoterapia/Multiterapia (oral)	Varios	Numerosos estudios Fase II, primeros Fase III
ABT-888 (Veliparib)	Abbott Chemical	Monoterapia/Multiterapia (oral)	Tumores sólidos y leucemias	Fase I & II
BMN-673	Lead Therapeutics	Monoterapia	Tumores sólidos y leucemias	Fase I, Fase III (mama)
BSI-201 (Iniparib)	BiPar	Monoterapia/Multiterapia con gemcitabin, carboplatino, TMZ (i.v.)	Varios	Varios estudios Fase III completados
CEP-9722	Cephalon	Multiterapia	Tumores sólidos	Fase I
E7016 (GPI-21016)	MGI Pharma	Multiterapia con TMZ (oral)	Tumores sólidos (excl. GBM) & melanoma	Fase I & II
INO-1001	Inotek/ Genentech	Monoterapia/Multiterapia con TMZ (oral)	Melanoma	Fase I
MK4827 (Niraparib)	Merck	Monoterapia (oral)	Sólidos, ovario BRCA negativos	Fase II (linfoma), Fase III (mama)

Tabla 1.- Inhibidores de PARP-1 en fase clínica, tipos de tumores en los que se han ensayado y estado de los estudios completados hasta la fecha. Se destaca en rojo iniparib (BSI-201) que tras su fracaso en los estudios de Fase III ya no es considerado un inhibidor de PARP-1.

Como curiosidad cabe destacar el caso de iniparib o BSI-201, que aparece resaltado en la **Tabla 1** en color rojo. Aunque los resultados preliminares de los primeros ensayos clínicos fueron prometedores, el fracaso de los resultados presentados con pacientes de cáncer de mama triple negativos en el *2011 Annual ASCO Meeting* puso en marcha una reevaluación *in vitro* de la molécula como inhibidor de PARP-1 (Patel *et al.*, 2012). Finalmente, a la luz de estos nuevos estudios se descubrió que el iniparib es un inhibidor débil de PARP-1 y por lo tanto todos los datos clínicos obtenidos hasta la fecha deberían ser evaluados con precaución (Mateo *et al.*, 2013).



OBJETIVOS



Objetivos

En los últimos años, el descubrimiento de funciones celulares de PARP-1 no relacionadas con los procesos de reparación del DNA en la célula han demostrado que presenta una intensa actividad en la regulación de la transcripción génica. Esta regulación se produce bien por la modificación postraducciona l de otras proteínas como factores de transcripción los cuales son poli(ADP-ribosil)ados, o bien por interacciones directas proteína-proteína en las que PARP-1 actúa bien como co-activador o como co-represor. Una de las proteínas a las que se une PARP-1 es E2F-1, uno de los principales reguladores del ciclo celular y en especial de la fase de síntesis del DNA.

El objetivo de esta tesis es el estudio funcional de esta interacción, caracterizando los efectos de la ausencia o presencia de PARP-1 sobre la proliferación celular, el desarrollo embrionario o el proceso oncogénico, utilizando para este caso un modelo ya caracterizado de gliomagénesis.



MATERIALES Y MÉTODOS





Materiales y métodos

1. Ratones modificados genéticamente

1.1. Condiciones de estabulación

Las colonias de ratones necesarias para la realización de este estudio fueron estabulados siguiendo las condiciones de alojamiento y manejo establecidos en el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. El alojamiento de las cepas utilizadas se llevó a cabo en salas SPF (*specific pathogen free*) en microaisladores con fases de 12 horas de luz/oscuridad. La eutanasia se realizó por inhalación CO₂.

1.2. Ratones knock-out *Rb1*

La inserción de un casete de expresión de neomicina en el intrón 3 del gen impide la expresión de pRB en estos ratones de trasfondo C57Bl6/J (Jacks *et al.*, 1992). Esta mutación conlleva una letalidad embrionaria en torno al estadio embrionario E13,5 debido a los graves defectos producidos en el desarrollo del sistema hematopoyético y nervioso. Debido a esto, es necesario mantener la colonia en heterocigosidad y los embriones de genotipo *Rb*^{-/-} que se describen más adelante se obtuvieron mediante el cruce de ratones heterocigotos.

1.3. Ratones knock-out *PARP1*

En el caso de estos ratones, cedidos por el Prof. de Murcia, la expresión de la proteína PARP-1 se interrumpe por la inserción en el intrón 4 de su gen de un casete PGK-neo compuesto por el promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK) acompañado del gen de resistencia de neomicina (Menissier de Murcia *et al.*, 1997). Aunque esta proteína está implicada en varios mecanismos de reparación del DNA, su deficiencia no resulta fatal durante el desarrollo embrionario aunque los individuos adultos deficientes de PARP-1 demuestran una hipersensibilidad a agentes genotóxicos y radiación ionizante.

1.4. Ratones condicionales *Rb1*

Esta cepa de ratones, cedidos por el *Mouse Models of Human Cancer Consortium* (MMHHC), y de trasfondo FVB/N:129Sv portan una mutación condicional en el exón 19 del gen *Rb1* (Marino *et al.*, 2000). Esta mutación condicional consiste en la introducción de dos secuencias de reconocimiento específico de la recombinasa CRE que flanquean al exón. En el caso de la expresión conjunta de dicha recombinasa, la secuencia correspondiente al exón sería eliminada y por tanto la expresión de la proteína pRB interrumpida.

1.5. Genotipado

El genotipo de cada ratón se determinó a partir de 0,5 μg aproximadamente de DNA procedente de una biopsia de la cola. Cada muestra de tejido se procesó incubándola en 150 μL de tampón de lisis (50 mM Tris·HCl pH 8, 100 mM NaCl, 100 mM EDTA, 1% SDS) y Proteinasa K (Sigma) a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a 55°C durante 2 horas. Transcurrido ese tiempo, las muestras fueron centrifugadas (13000 rpm, 5 min) para eliminar los restos no digeridos, recogiendo los sobrenadantes de los que se precipitó el DNA añadiendo un volumen de isopropanol. A continuación, el DNA de cada muestra se recogió tras centrifugación (13000 rpm, 5 min, 4°C), se lavó con un volumen de etanol 70% y se repitió la centrifugación para finalmente resuspender el pellet de DNA en agua miliQ.

El siguiente paso consiste en la amplificación de la secuencia específica de cada genotipo utilizando los respectivos juegos de oligonucleótidos cebadores recogidos en la **Tabla 2**. Para dicha amplificación se usaron condiciones estándar con un ciclo inicial de desnaturalización (95°C, 3 minutos), 30 ciclos de amplificación (95°C, 1 minuto; 60°C, 1 minuto; 72°C, 1 minuto) y un ciclo de elongación final (72°C, 10 minutos) como paso previo a su resolución por electroforesis en gel de agarosa.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Gen
RXR	AATTGCGGCCGCATCTGCATCTTTATCGC	<i>Rb1</i>
RI3	CCCATGTTCCGGTCCCTAG	<i>Rb1</i>
PGK3	GAAGAACGAGATCAGCAG	<i>Rb1</i>
PARP-1 5'	GTCCTGCCTTGTTATTCCCT	<i>Parp-1</i>
PARP-1 3'	CCACCTACCCTTCATTCTT	<i>Parp-1</i>
Neo	ACGAGACTAGTGAGACGTGC	<i>Parp-1</i>
R007	GGCGTGTGCCATCAATG	<i>Rb1^{flox/flox}</i>
R008	AACTCAAGGGAGACCTG	<i>Rb1^{flox/flox}</i>

Tabla 2.- Secuencias de oligonucleótidos cebadores utilizados para el genotipado de los ratones modificados genéticamente.

2. Cultivos celulares y tratamientos

2.1. Cultivo primario de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs)

Se obtuvieron fibroblastos embrionarios de ratón a partir de embriones E13,5 de genotipos *Parp-1^{-/-}*, *Rb^{-/-}*, *Parp-1^{-/-} Rb^{-/-}* y *Parp-1^{+/+} Rb^{+/+}* (o *wild-type*, WT). Una vez extraídos, los embriones fueron procesados y disgregados en un ambiente estéril dentro de una campana de flujo laminar, eliminando los órganos que puedan ser fuente de contaminación del cultivo con otros tipos celulares como es el caso del hígado o cerebro. Los fragmentos de cada embrión se recogieron en un tubo estéril y se lavaron dos veces con PBS (D8662, Sigma-Aldrich). Una vez retirado el PBS, se incubaron en un volumen apropiado de tripsina-EDTA 0.05% (25300-062, Gibco) y se mantuvieron a 37°C durante media hora, homogeneizando varias veces durante este intervalo con la ayuda de una micropipeta. A continuación, se añadió medio de cultivo DMEM (*Dulbecco modified Eagle medium*, D6046, Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de suero fetal bovino o FBS (26400-044, Gibco) hasta

un volumen de 10 mL, y con la ayuda de una pipeta se homogenizó la mezcla de nuevo y tras un breve centrifugado (1000 rpm, 5 min., temperatura ambiente) se eliminó el sobrenadante. Finalmente, los homegenados de cada embrión se resuspendieron en 9 mL de DMEM completo y sembraron en una placa de 100 mm de diámetro (353003, BD Falcon).

En paralelo, parte de los embriones que no fueron homogeneizados se utilizó para resolver los genotipos de cada uno de los embriones, tal y como se detalló en el apartado 1.5. Las células de cada genotipo se mantuvieron en el interior de un incubador a 37°C y 5% de CO₂ hasta alcanzar la confluencia, momento a partir del cual (pase 0) fueron tripsinizadas de nuevo con el objetivo de expandir el cultivo y/o congelar para mantener stocks en nitrógeno líquido.

2.2. *Cultivo primario de astrocitos*

Los astrocitos de ratón usados en los experimentos descritos fueron aislados a partir de cerebros de neonatos de 3 días de edad. Los cerebros se recogieron en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar, fueron disgregados en fragmentos de aproximadamente 2 mm y el homogenado resultante se tamizó haciéndolo pasar a través de filtros porosos de 40 µm (352340, BD Falcon). A continuación, las células tamizadas se recogieron centrifugándolas durante 5 minutos a 1000 rpm y el pellet resultante se resuspendió en DMEM suplementado con 10% de FBS y se sembró en placas de 100 mm. Tras 24 horas de incubación, se lavó el cultivo con PBS para eliminar los restos de tejido y se reemplazó el medio con medio fresco. Los astrocitos no se mantuvieron más de 5 días en la misma placa antes de comenzar el experimento.

2.3. *Obtención de fibroblastos 3T3*

Para la inmortalización de los fibroblastos embrionarios obtenidos tal y como se describe en la sección 2.1. se siguió el protocolo publicado por George Todaro y Howard Green (Todaro y Green, 1963). Para ello se

sembraron $3 \cdot 10^5$ fibroblastos de cada uno de los genotipos en placas de 100 mm, se mantuvieron en cultivo durante 3 días pasados los cuales se recogieron tras tripsinizarlos y se volvieron a sembrar en igual densidad hasta alcanzar al menos 30 pases antes de ser utilizadas en los subsiguientes experimentos.

2.4 *Transfección y transducción retroviral*

Dada la dificultad de transfectar determinadas líneas celulares consideramos oportuno utilizar un método alternativo para la introducción de genes exógenos como es el caso de la infección retroviral. Para ello, utilizamos la línea celular empaquetadora de retrovirus ecotrópicos Phoenix (Swift *et al.*, 2001) que fue transfectada con los plásmidos retrovirales detallados en la sección 3.1. La transfección se llevó a cabo complejando 15 μg del plásmido retroviral correspondiente con polietilenimina ramificada o PEI25 (408727, Sigma-Aldrich) en una proporción 1:5, es decir, 5 μg de PEI25 por cada μg de DNA (Boussif *et al.*, 1995). El medio conteniendo los complejos DNA-PEI25 se mantuvo durante 24 horas, transcurridas las cuales se retiró y se lavaron las células Phoenix con PBS para a continuación añadir 10 mL de medio DMEM fresco. A las 48 horas se recogió el sobrenadante retroviral y se filtró usando filtros de 0,45 μm (Millipore) de tamaño de poro para eliminar cualquier célula que pudiera ser arrastrada. Este sobrenadante fue añadido a los astrocitos o MEFs sembrados el día anterior, a los cuales además se les suplementó polibreno (H9268, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las células se mantuvieron durante 48 horas con este medio retroviral para a continuación ser seleccionadas con 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de puromicina durante 48 horas adicionales en las que las células no infectadas serán eliminadas de las placas de cultivo.

2.5. *Sincronización de cultivos*

Para la sincronización de los cultivos celulares en la interfase G_1/S del ciclo celular se emplearon dos métodos que detallamos a continuación. El primero de ellos consiste en el tratamiento de las células, en este caso

fibroblastos embrionarios de ratón o MEFs, con medio pobre en suero fetal bovino (0,5% FBS) durante 44-48 horas. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio serodeprivado, se lavaron las células con PBS y se reemplazó el medio con DMEM 15% FBS, liberando a las células de su arresto. El segundo de los métodos consiste en el tratamiento de las células, en este caso HEK 293, con dos pulsos de timidina en exceso (2 mM). Transcurridas 24 horas tras el sembrado de las células, se retira el medio y se reemplaza con medio con timidina durante 12 horas. A continuación, se retira el medio, se lava las células con PBS y se añade medio DMEM al 10% de FBS y que mantendremos durante 9 horas. De esta manera nos aseguramos que las células que hayan sido arrestadas en una fase distinta de G₁/S puedan avanzar hasta alcanzar este punto del ciclo. Por último, transcurridas las 9 horas reemplazamos el medio de nuevo por medio con timidina y que mantendremos durante 12 horas, a partir de las cuales las células pueden ser liberadas para sus respectivos tratamientos (Jackman y O'Connor, 2001).

2.6. Incorporación de 5-etinil-2'-deoxiuridina (EdU).

Para la realización de este experimento, se sembraron 5000 fibroblastos embrionarios (MEFs) por cm² en una placa de 24 multipocillos con cubreobjetos circulares de vidrio de 12 mm de diámetro. Transcurridas 24 horas se cambió el medio por medio serodeprivado (DMEM 0,5% FBS) y se mantuvo durante 44-48 horas, tras las cuales se reemplazó por medio rico en FBS (15%) durante 16 horas, incluyendo los tratamientos con inhibidores de PARP-1. A continuación, se trataron las células con 5-etinil-2'-deoxiuridina o EdU (T511285, Sigma-Aldrich) hasta una concentración final de 10 μM, que al ser un análogo del nucleósido timidina se incorporará al DNA de las células durante su replicación (Salic *et al.*, 2008). La duración del pulso de EdU varía según el tipo celular, siendo de 2 o 3 horas para fibroblastos o de 4-5 horas para los astrocitos. Finalizado el tratamiento, se lavaron las células con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 2% pH 7,4 durante 20 minutos en oscuridad. A continuación se retiró el paraformaldehído, se lavaron las células dos veces con una solución de albúmina de suero bovino (BSA) al 3% en PBS y se

permeabilizaron con una solución 0,5% Tritón X-100 en PBS durante cuatro minutos. Tras otros dos lavados con BSA al 3% en PBS, se trataron las células con la solución de tinción (100 mM Tris-HCl pH 8,5, 1 mM CuSO₄, 10 µM ROX-azida, 100 mM ácido ascórbico) durante media hora a temperatura ambiente. Por último, se incubaron las células durante una hora con una solución 0,2 µg/mL de Hoechst 33258 (fluorescencia azul) durante 45 minutos en oscuridad, se retiró la solución de tinción, se lavaron las muestras para eliminar los restos y se montaron los cubreobjetos sobre portaobjetos con el medio de montaje acuoso.

2.7. Tratamiento con inhibidores de PARP-1

Para los tratamientos con inhibidores de PARP-1 se ha optado por cinco moléculas conocidas por su importancia histórica (3-aminobenzamida, NU1025), su uso en ensayos preclínicos (TIQ-A, PJ34) e incluso ensayos clínicos (ABT-888). Además, se incluyó una sexta molécula (Gosipol) recientemente identificada como capaz de interferir en las interacciones proteína-proteína de PARP-1 mediadas por el dominio BRCT (Na *et al.*, 2015). Como paso previo, se prepararon varias disoluciones concentradas (100X) que sirvieron para tratar cada grupo experimental y las concentraciones finales se muestran en la **Tabla 3**.

Compuesto	Concentración final	% DMSO final
3-AB	5 mM	1%
TIQ-A	50 µM	0,1%
NU1025	100 µM	0,1%
ABT-888 (Veliparib)	10 µM	N/A
PJ34	10 µM	N/A
Gosipol	25 µM	0,5%

Tabla 3- Lista de inhibidores de PARP-1 y sus concentraciones finales. Se indica además la concentración final de DMSO en los grupos tratados con inhibidores que lo incluyen.

2.8. Tratamiento con cicloheximida

Para el ensayo de vida media de E2F-1 se sembraron células HEK293 en placa multipocillo de 12 pocillos a una densidad de $5 \cdot 10^4$ células/cm² que fueron transfectadas con cantidades equimolares de los plásmidos pEGFP-PARP-1 (cedido por A. Chiarugi) y pRFP-E2F-1 (cedido por B. Su) con la ayuda de PEI25 (1X) tal y como se ha descrito anteriormente. Tras sincronizar el cultivo por el método de doble timidina descrito más arriba, se liberaron las células con medio DMEM fresco y se añadieron los tratamientos (PJ34 y gopipol) con sus respectivos controles además de cicloheximida (C7698, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 35 μ M.

3. Plásmidos

3.1. Plásmidos retrovirales

La **Tabla 4** recoge los plásmidos utilizados en las infecciones retrovirales descritas más adelante. Todas las transfecciones de la línea productora de retrovirus Phoenix-Eco se realizaron con la ayuda de PEI25 en las condiciones descritas más arriba.

Nombre	Vector parental	Origen
pBABE-puro	pBABE-puro	P.P. Pandolfi
pBABE-Ras ^{V12}	pBABE-puro	P.P. Pandolfi
PIG-puro	pMSCV-puro	P.P. Pandolfi
PIG-CRE	pMSCV-puro	P.P. Pandolfi
pBABE-PARP1	pBABE-puro	-

Tabla 4.- Lista de los vectores utilizados en transducciones retrovirales. Los vectores virales de expresión de los mutantes de PARP-1 fueron obtenidos mediante mutagénesis dirigida utilizando pBABE-PARP1 como origen.

3.2. Otros plásmidos

La **Tabla 5** presenta la relación de plásmidos no retrovirales usados en otras transfecciones. Todas las transfecciones se realizaron con la ayuda de PEI25 en las condiciones descritas más arriba.

Nombre	Vector parental	Origen
pRFP-E2F-1	pDsRed-C1 (Clontech)	B. Su (Shi <i>et al.</i> , 2013)
pEGFP-PARP-1	pEGFP-N1 (Clontech)	A. Chiarugi (Lapucci <i>et al.</i> , 2011)
pE2F-Luc	pGL3-Basic (Clontech)	M. Collado
pCMV- β -Gal	pCMV- β -Gal	Clontech
pCMV-Flag-E2F-1	pCMV-neo	-
pCMV-Flag-E2F-1 (S31A)	pCMV-neo	F. Dick (Carnevale <i>et al.</i> , 2012)
pCMV-Flag-E2F-1 (S31D)	pCMV-neo	-

Tabla 5.- Lista de los vectores no retrovirales utilizados en transfecciones.

3.3. Mutagénesis dirigida por PCR

Para la obtención del mutante de E2F-1^{S31D} empleó la técnica de mutagénesis dirigida por PCR (PCR-SDM) (Zheng *et al.*, 2004). Para ello se diseñó un juego específicos de oligonucleótidos para esta secuencia con un cebador *forward* S31D-F (5' TCGACTCCGATCAGATCGTCATCATCTCCGCC 3') y el *reverse*, S31D-R (5' ATGACGATCTGATCGGAGTCGAGCAGCCGAG 3'). Para la PCR se utilizó la polimerasa de alta fidelidad Phusion (Thermo Scientific) según las indicaciones recomendadas para esta técnica. Para eliminar el vector parental se utilizó la endonucleasa *DpnI*, y se recuperó el DNA amplificado mediante el kit comercial *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel) que fue usado posteriormente para transformar bacterias competentes.

4. PCR semi-cuantitativa (RT-PCR)

Para los ensayos de PCR semi-cuantitativa (RT-PCR) se purificó el RNA total de fibroblastos embrionarios control, tratados o transducidos retroviralmente como se detalló en la sección anterior. Una vez seleccionados, se sembraron a razón de $4 \cdot 10^4$ células/cm² en placas de 100mm y se sincronizaron durante 44 horas por serodeprivación. Las células se liberaron del arresto y se dejaron en medio rico en factores (DMEM 15% FBS) durante 16 horas antes de extraerse el RNA. Para la extracción del RNA se empleó el kit comercial *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez obtenidas todas las muestras éstas fueron cuantificadas y se empleó 1 µg de RNA total de cada una de ellas en la síntesis del DNA copia (cDNA) por retrotranscripción usando para ello el kit comercial *SuperScript III First-Strand Synthesis System* (Invitrogen) en un termociclador con las siguientes condiciones:

Temperatura (°C)	Tiempo/ciclo	Ciclos
37	50 min	1
42	15 min	1
95	5	1
4	∞	1

Tras obtener el cDNA se procedió a tomar cantidades iguales de cada muestra (3 µL/reacción) para su análisis por PCR semi-cuantitativa. Para ello, simplemente se amplificaron las secuencias específicas de cada gen usando para ello el par de oligonucleótidos apropiado cuyas secuencias se acompañan en la **Tabla 6**. Como control de carga se amplificó parte de la secuencia del gen de la subunidad 18S del ribosoma con los oligonucleótidos indicados a continuación.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Gen
qE2F1-F	CTCGACTCCTCGCAGATCG	<i>E2f-1</i>
qE2F1-R	AGCTCGGCGAGAAAAGAAATC	<i>E2f-1</i>
qPOLA1-F	GAAGAACGAGATCAGCAG	<i>Pola1</i>
qPOLA1-R	CCACATAGCCTATCCCATCGTC	<i>Pola1</i>
qWIP1-F	GATGTATGTAGCGCATGTAGGTG	<i>Wip1</i>
qWIP1-R	GTTCTGGCTTGTGATCTTGTGT	<i>Wip1</i>
18S-F	TTGACGGAAGGGCACCACCAG	<i>18S</i>
18S-R	CTCCTTAATGTCACGCACGATTC	<i>18S</i>

Tabla 6.- Secuencias de oligonucleótidos cebadores utilizados para la amplificación de secuencias de cDNA usadas en la PCR semi-cuantitativa (RT-PCR).

5. Microscopía confocal

Para los ensayos de co-localización se sembraron $5 \cdot 10^4$ células HEK293 por cm^2 en portaobjetos multipocillo EZ-slide de Millipore. Tras 24 horas se transfectaron las células con cantidades equimolares de los plásmidos pEGFP-PARP-1 (cedido por A. Chiarugi) y pRFP-E2F-1 (cedido por B. Su) con la ayuda de PEI25 (1X) tal y como se ha descrito anteriormente. Transcurridas 12 horas tras la transfección procedemos a retirar el medio y lavar las células con PBS para a continuación sincronizar el cultivo por el método de doble timidina descrito anteriormente. Una vez liberadas las células, procedemos a tratarlas a distintos tiempos (dos, cuatro y seis horas) y fijarlas con paraformaldehído 2% pH 7.4 durante veinte minutos en oscuridad. A continuación se retiró el paraformaldehído, se lavaron las células dos veces con PBS y se permeabilizaron con una solución 0,5% Tritón X-100 en PBS durante cuatro minutos. Para el marcaje nuclear procedimos a incubar las células con una solución 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DAPI (fluorescencia azul). Por último,

una vez montadas las muestras se visualizaron utilizando un microscopio confocal Leica TCS SP2.

6. Ensayos de actividad luciferasa y beta-galactosidasa

Los ensayos de actividad luciferasa se llevaron a cabo bien con células HEK293 las cuales se sembraron en placas multipocillo de 12 pocillos a una densidad de $4 \cdot 10^5$ células por cm^2 o con fibroblastos de ratón (MEFs), sembrados en placas multipocillos de 24 pocillos a una densidad de 2500 células por cm^2 . Una vez sembradas, las células fueron co-transfectadas de manera similar a la descrita anteriormente; el primero de los vectores contiene la secuencia codificante de la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) cuya expresión se encuentra regulada por un promotor que contiene los elementos de respuesta de E2F-1, mientras que el segundo porta el gen de la beta-galactosidasa controlado por el promotor del citomegalovirus (CMV). Una vez transfectadas, se sincronizaron las células bien por el método de la doble timidina, en el caso de las HEK293, o por serodeprivación, en el de los MEFs, y tras el cual se aplicaron los tratamientos con los diferentes inhibidores de PARP-1 durante 8 horas en medio DMEM fresco suplementado con 10% de FBS. Tras el tratamiento se recogieron en frío las células en medio de lisis (25 mM Tris·HCl pH 7,8, 2 mM EGTA, 2 mM DTT, 10% Glicerol, 1% Tritón X-100) con la ayuda de un raspador. Una vez lisadas, se centrifugaron los lisados durante 5 minutos a 13000 rpm (4°C) y se transfirieron los sobrenadantes a nuevos eppendorf. A continuación, se cuantificó la actividad luciferasa con un luminómetro Lumat LB 9507 (Berthold Technologies) usando el tampón de actividad luciferasa (25 mM Tris·HCl pH 7,8, 4 mM EGTA, 20 mM MgSO_4 , 2 mM ATP, 1 mM DTT) y D-luciferina 1 mM. Estos datos se normalizaron por medio de la actividad beta-galactosidasa de cada lisado medida en buffer Z (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , 50 mM β -mercaptoetanol, ajustado a pH 7) y ONPG (orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido). La mezcla de reacción se incubó a 37°C en oscuridad

durante al menos dos horas para a continuación detener la reacción añadiendo Na_2CO_3 1M y registrar la absorbancia a 420 nm en un espectrofotómetro (BioMat 3, Thermo). Cada ensayo se realizó por triplicado para cada grupo experimental y al menos tres veces por ensayo.

7. Inmunoprecipitación

Para los ensayos de inmunoprecipitación se sembraron HEK293 a una densidad de $4 \cdot 10^4$ células/cm² en una placa multipocillo de 6 pocillos. Transcurridas 24 horas se transfectaron con cantidades equimolares de pcDNA3-6xHis-PARP-1 y pCMV-Flag-E2F-1, pCMV-Flag-E2F-1^{S31A}, pCMV-Flag-E2F-1^{S31D}, respectivamente. Una vez transfectadas, se sincronizaron los cultivos por el método de la doble timidina. Además, para el tratamiento de uno de los grupos con etopósido se añadió hasta una concentración final de 25 μM durante 8 horas. A continuación, se liberó a las células del arresto y se procedió a recoger los lisados de cada uno de los grupos experimentales con tampón de lisis (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 2 mM EDTA, 10% glicerol, 1% Tritón X-100, 1 mM NaF, 1 mM DTT, 2,5 mM glicerolfosfato e inhibidores de proteasas). Una vez recogidos los lisados se dejaron incubando en hielo durante 10 minutos adicionales y se centrifugaron a 4°C durante 5 minutos a 13000 rpm. Se cuantificó la proteína total de los sobrenadantes y se prepararon en tubos eppendorf individuales 500 μg de proteína total acompañados de 5 μg de anticuerpo anti-FLAG M2 (F1804, Sigma-Aldrich) y *beads* conjugadas con proteína A/G (Protein A/G PLUS-Agarose, Santa Cruz). Se incubaron las muestras durante toda la noche a 4°C con rotación continua. A la mañana siguiente se recuperaron las *beads* por centrifugación (5 min, 1000 rpm, 4°C) y se lavaron tres veces, 5 minutos cada uno, con el mismo tampón utilizado para el lisado de las células. Una vez finalizados los lavados se recuperó la proteína de las *beads* desnaturalizando las muestras a 95°C durante 5 minutos con tampón SDS de electroforesis 1X (66 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 0.01% azul bromofenol, 10% glicerol, 10

mM DTT). Una vez hervidas se recuperaron los sobrenadantes evitando arrastrar las *beads* y se cargaron en un gel de poliacrilamida del 8% para su resolución por SDS-PAGE y análisis por *western-blot*.

8. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Se sembraron $1 \cdot 10^6$ fibroblastos embrionarios en placas de 100 mm 24 horas antes de comenzar el experimento. Para el *crosslinking* de la heterocromatina se trataron las células con paraformaldehído neutralizado al 37% (concentración final 1%) durante 10 minutos, transcurridos los cuales se detuvo la reacción añadiendo glicina 1M hasta una concentración final de 125 mM. Se recogieron las células con PBS suplementado con inhibidores de proteasas y se dejaron reposar las muestras durante 10 minutos en hielo. Con el objetivo de fragmentar el DNA, se sonicaron las muestras utilizando un sonicador Branson Sonifier 250 (amplitud 20%) durante 15 pulsos de 30 segundos cada uno y manteniendo en todo momento las muestras en hielo. A continuación se centrifugaron las muestras durante 5 minutos (13000 rpm, 4°C) quedándonos solamente con los sobrenadantes. Estos sobrenadantes se diluyeron usando el buffer apropiado del kit comercial EZ-ChIP (17-371, Millipore), se tomó el 10% del volumen final para analizar los inputs y se añadieron las *beads* (proteína A/G) y los anticuerpos correspondientes (anti-PARP-1 (H-300, Santa Cruz), anti-E2F-1 (C-20, Santa Cruz)) o en el caso del control IgG de conejo (I5006, Sigma-Aldrich). Los lisados con las *beads* y los anticuerpos se incubaron durante toda la noche a 4°C y con rotación constante. A la mañana siguiente se centrifugaron las muestras (cinco minutos, 1000 rpm, 4°C) y se lavaron las *beads* con lavados secuenciales con los tampones que incluye el kit (Low Salt, High Salt, LiCl) para al final eluir la heterocromatina en tampón TE. Como pasos finales, se revirtió el *crosslinking* de los complejos proteína/DNA incubando con NaCl 5M a 65°C durante 4 horas, se añadió RNasa A para eliminar el RNA y también proteinasa K para eliminar las proteínas presentes de las muestras. Por último, se purificó el DNA

con las minicolumnas y tampones de lavado que incluye el kit comercial, siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenidos los fragmentos de DNA purificados, éstos se analizaron mediante PCR empleando oligonucleótidos que se hibridan específicamente en los lugares de unión de E2F-1 de los promotores de E2F-1 (E2F1-F 5' ATCGGAGCCTCCGTCGTCACA 3', E2F1-R 5' AGGCCGCGGCGAGGGCTCGAT 3') y ciclina A (CycA-F 5' TGTAAGATTCCCGTCGGGCCTTC 3', CycA-R 5' AGGCGGGAGGAGCGTAGAGCC 3') (Rayman *et al.*, 2002).

9. Curvas de proliferación

Una vez que los astrocitos infectados fueron seleccionados, se sembraron en una densidad de 2500 células/cm² en placas de 24 pocillos (353043, BD Falcon). Para la construcción de la curva se tomaron placas a los días uno, tres, cinco y siete y se lavaron dos veces con PBS para a continuación fijar las células con una solución 1:3 de ácido acético glacial y metanol durante 15 minutos. Seguidamente, se aplicó la solución de tinción consistente en una dilución al 0,1% de cristal violeta (HT90132, Sigma-Aldrich) en PBS durante 30 minutos, transcurridos los cuales se procedió a lavar el exceso de colorante con PBS. A continuación se cuantificó la cantidad de colorante retenido por las células fijadas destiñéndolas con una solución al 10% de ácido acético y se midió por triplicado la absorbancia del destiñido en un espectrofotómetro a 590 nm de longitud de onda. Cada grupo experimental se sembró por triplicado y los experimentos se repitieron en al menos tres ocasiones.

10. Ensayos de transformación celular

Para los ensayos de transformación se utilizaron ratones SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*). Estos ratones padecen inmunodeficiencia

combinada severa careciendo de un sistema inmunológico completamente funcional al carecer de células T y B. Es esta característica la que hace de los ratones SCID un modelo ideal para comprobar *in vivo* la capacidad de formación de tumores (Bosma *et al.*, 1983).

El implante de las células se llevó a cabo por medio de una inyección subcutánea en la que se introdujeron en el lomo de cada ratón 3 millones de astrocitos resuspendidos en un volumen de 0,1 mL de PBS 1X. Los ratones inyectados se controlaron semanalmente, y se consideró que se había desarrollado tumor cuando la masa tumoral presentaron un diámetro superior a 4 milímetros. Para el cálculo del volumen del tumor se asumió una forma elipsoide y se empleó la fórmula $\frac{1}{2} \cdot (\text{Longitud} \times \text{ancho})$ (Euhus *et al.*, 1986). Para los tratamientos con PJ34, se administró una única dosis (10 mg/kg) en el espacio intraperitoneal del ratón y se siguió su evolución midiendo su volumen dos veces por semana. Una vez que los tumores alcanzaron un diámetro cercano a los 12 mm los animales fueron sacrificados y se les realizó la necropsia.

11. Senescencia y cuantificación de la apoptosis

Los ensayos de actividad SA- β -gal se realizaron utilizando un kit de tinción de β -galactosidasa (Cell Signaling). Al igual que en las curvas de proliferación, se sembraron las células a una densidad de 1250 (líneas celulares) o 2500 (astrocitos primarios) células por cm^2 en cada pocillo de una placa de 24 pocillos, tres replicados por grupo. La cuantificación de la apoptosis se realizó mediante cuantificación de núcleos apoptóticos. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33258 (Sigma) a una concentración de 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 30-45 minutos en oscuridad. Las células se lavaron dos veces con PBS y se visualizaron utilizando un microscopio de fluorescencia Olympus IX70. Los experimentos se repitieron en al menos tres ocasiones.

12. Inmunoblot

La extracción de proteína total de muestras procedentes de células se realizó mediante la lisis celular con tampón RIPA (1x PBS, 1% Nonidet P-40, 0,5% deoxicolato sódico, 0,1 % SDS, 10 mg/ml PMSF, 40 µg de aprotinina/ml, 100 mM ortovanadato, 50 mM fluoruro sódico). Los lisados se incubaron en este tampón durante 30 minutos en hielo y seguidamente se sometieron a dos pulsos de sonicación de tres segundos. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 minutos (4°C) recogiendo el sobrenadante donde se encuentra el extracto de proteína total de las células. Una vez cuantificada la proteína se cargaron 40 µg del extracto de cada muestra en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). El análisis de las proteínas se llevó a cabo utilizando los anticuerpos policlonales anti-PARP-1 (H-300, Santa Cruz), anti-E2F-1 (C-20, Santa Cruz), anti-ciclina A (C-19, Santa Cruz), anti-p53 (CM5, Cell Signaling), anti-p-p53 Ser15 (9284, Cell Signaling), anti-p38MAPK (C-20, Santa Cruz), anti-p-p38MAPK (Thr180/Tyr182) (sc-17852, Santa Cruz), anti-p16 (M-156, Santa Cruz), anti-γH2AX Ser139 (sc-101696, Santa Cruz), anti-Wip1 (H-300, Santa Cruz) y los anticuerpos monoclonales anti-ciclina D1 (DCS6, Cell Signaling), anti-β-actina (MAB1501, Millipore), anti-pan-Ras^{V12} (Ab-1, Calbiochem), anti-α-Tubulina (T5168, Sigma-Aldrich) y anti-Rb (554136, BD). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron el oveja anti-ratón y burro anti-conejo IgG conjugados con HRP (GE Healthcare).

13. Histología e inmunohistoquímica

Para el análisis de eritrocitos fetales se utilizó la tinción de Wright-Giemsa. Para ello, primeramente se depositó una muestra de sangre de cordón umbilical (entre 5 y 10 µL) sobre un portaobjetos y se realizó una extensión con la ayuda de un segundo portaobjetos aplicado en un ángulo de aproximadamente 45° con el fin de individualizar las células de la muestra. Una vez completamente secos, a los frotis de sangre se les aplicó la tinción de

Wright-Giemsa durante un minuto, transcurrido el cual se lavaron las tinciones con el tampón fosfato pH 7,2 durante 10 minutos. Finalmente, se lavaron con agua desionizada y se dejaron secar bien al aire antes de tomar fotos en el microscopio.

También se recogieron otras muestras de tejido como hipófisis (normales y adenomas) de ratones de entre nueve y quince meses de edad y embriones, que fueron extraídos de hembras gestantes a partir de la visualización del tapón vaginal. La viabilidad de los embriones se determinó por la observación de latido cardíaco. Para el procesamiento de las muestras, tanto de hipófisis como de embriones, éstas se fijaron en paraformaldehído al 10% pH 7 y se incluyeron en parafina. Para las tinciones con hematoxilina-eosina se realizaron cortes de los bloques de parafina de 4-5 micras. A continuación, se desparafinan los cortes sumergiéndolos en xilol durante 10 minutos y se hidratan lavando los cortes con diferentes etanoles (3 x 100%, 1 x 96%, 1 x 70%). Hecho esto, se pasaron a la tinción de hematoxilina durante 5 minutos y se lavan con agua bajo el grifo. A continuación, se pasaron a la de eosina durante 30 segundos, lavando bajo el grifo para eliminar el exceso. Finalmente, se deshidrataron con etanol (1 x 96%, 3 x 100%) y aclararon con xilol durante 1 minuto.

La inmunohistoquímica se realizó con la ayuda de un kit de anticuerpo secundario que utiliza un polímero de dextrano marcado con peroxidasa conjugada (Envision Plus, Dako). Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-Caspasa 3 activada (monoclonal, Cell Signaling, USA) y histona H3 fosforilada (policlonal, Cell Signaling, USA). Como paso previo a la inmunotinción se realizó una recuperación de los antígenos mediante incubación de 20 minutos en tampón citrato pH 6 para la histona H3 fosforilada. La incubación con los anticuerpos primarios se llevó a cabo a 4°C durante toda la noche.



RESULTADOS



Resultados

1. Estudio de la interacción PARP-1/E2F-1 *in vitro*.

Tal y como hemos mencionado durante la introducción, Simbulan-Rosenthal y sus colaboradores describen en varios trabajos (Simbulan-Rosenthal *et al.*, 1999; Simbulan-Rosenthal *et al.*, 2003) que PARP-1 interacciona directamente con E2F-1 durante la fase S temprana actuando como co-activador del factor de transcripción. Según estos autores, la ausencia de PARP-1 tiene como resultado una reducción de la transactivación debida a E2F-1 en varios promotores regulados por esta proteína, tales como el de la DNA polimerasa alfa, PCNA, ciclina A o el del propio E2F-1. Curiosamente, este efecto no parece depender de la actividad enzimática de PARP-1 ya que E2F-1 no resulta poli(ADP-ribosilado) como sí ocurre con otros factores de transcripción cuya PARilación mediada por PARP-1 (p. ej., p53 y NF- κ B) afectan a su actividad transcripcional (Hassa y Hottiger, 2002; Kraus *et al.*, 2008). Atendiendo a la naturaleza de la interacción, los autores mediante diversos ensayos *in vitro* observaron que PARP-1 no parece unirse directamente a los promotores regulados por E2F-1, sino que se une a éstos a través de E2F-1 con su dominio central o de automodificación, que contiene un motivo BRCT (BRCA1 C *Terminus*) presente en otras proteínas que interaccionan con E2F-1 como TopBP1.

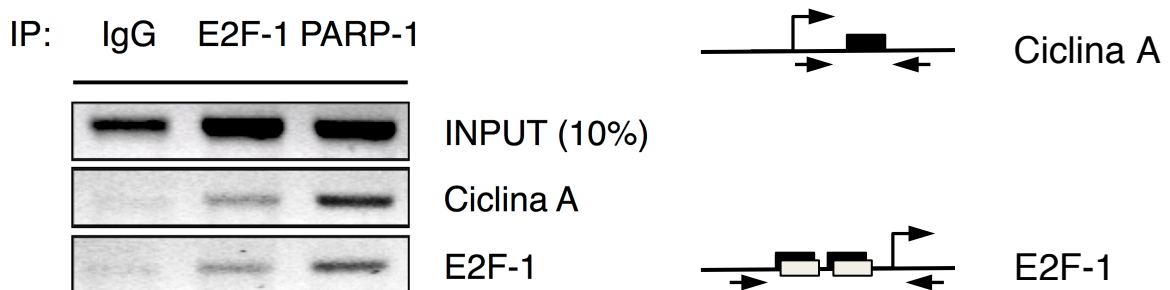


Figura 12.- Inmunoprecipitación de cromatina realizada con los anticuerpos de PARP-1, E2F-1 y como control negativo IgG de conejo. Se detectó la presencia de PARP-1 sobre los promotores de ciclina A y E2F-1 tal y como muestra la amplificación de las secuencias específicas de unión del factor de transcripción, cuyo esquema se muestra a la derecha.

Con el objetivo de profundizar en este posible mecanismo de regulación de E2F-1, y en base a los resultados ya conocidos, quisimos caracterizar la interacción entre PARP-1 y E2F-1 directamente en células y para ello realizamos un sencillo experimento de inmunoprecipitación de cromatina en fibroblastos de ratón, utilizando tanto anticuerpos policlonales de PARP-1 como de E2F-1, tal y como se recoge en la **Figura 12** en la página anterior. Mediante la amplificación de las secuencias específicas en los promotores de ciclina A y E2F-1 pudimos confirmar la presencia *in vivo* de la proteína PARP-1 acompañando al factor de transcripción E2F-1, lo cual corrobora los resultados obtenidos por *foot-printing* y EMSA (*electromobility shift assay*) previamente publicados (Simbulan-Rosenthal *et al.*, 1999; Simbulan-Rosenthal *et al.*, 2003).

En estos mismos estudios, se detalla de manera breve en un ensayo de retrotranscripción la influencia de la ausencia o presencia de PARP-1 en fibroblastos *Parp-1^{+/+}* y *Parp-1^{-/-}* sobre varias dianas transcripcionales de E2F-1. Con el objetivo de estudiar el efecto que la presencia o ausencia de PARP-1 pudiera tener sobre la actividad de E2F-1 analizamos mediante PCR semicuantitativa (RT-PCR) los niveles de mRNA de varios genes regulados por E2F-1 en fibroblastos *Parp-1^{+/+}*, en fibroblastos deficientes de PARP-1 y en fibroblastos *wild-type* tratados con un inhibidor de PARP-1 (PJ34). Como se indica en la **Figura 13** también incluimos un grupo con fibroblastos *Parp-1^{-/-}* transducidos retroviralmente con una copia intacta de PARP-1.

Gracias a este experimento podemos comprobar que la presencia de PARP-1 reduce de manera significativa la actividad transcripcional no sólo de la propia proteína E2F-1, sino que también sobre otras dianas transcripcionales de este factor como son el caso de la DNA polimerasa α , cuya inducción ocurre en la fase S temprana, o el de WIP-1. Precisamente, el hecho que podamos rescatar este descenso en los niveles de mRNA por medio de la re-expresión de una copia funcional de PARP-1 en fibroblastos *Parp-1^{-/-}* nos demuestra claramente el papel de PARP-1 como co-activador de la actividad transcripcional de E2F-1.

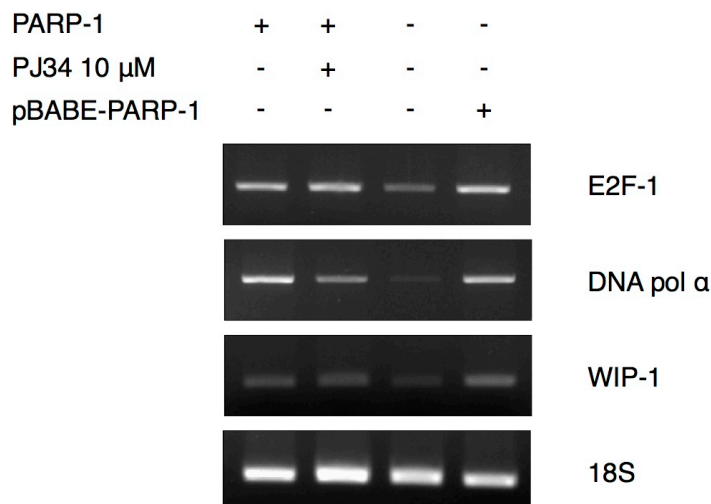


Figura 13.- RT-PCR de dianas transcripcionales de E2F-1. La ausencia del factor de transcripción E2F-1 reduce la transactivación de genes en la fase S temprana como la DNA polimerasa α y también de WIP-1, cuya expresión aparece en etapas posteriores de la fase S.

Tal y como explicamos en la introducción, la actividad del factor de transcripción E2F-1, y por ello la transición G_1/S , depende de manera rigurosa del estado de fosforilación del supresor de tumores retinoblastoma, pRB. De esta manera, mientras un pRB hipofosforilado es capaz de unirse a E2F-1 inhibiéndolo, la hiperfosforilación de esta proteína produce una serie de cambios alostéricos que modifican de manera drástica la interacción de estas dos proteínas dejando vía libre al factor E2F-1.

Esta circunstancia es aprovechada por un buen número de tipos tumorales que al inactivar pRB desregulan la actividad de E2F-1 y por tanto el ciclo celular en su propio beneficio (Malumbres *et al.*, 2001). En el caso de que PARP-1 realmente sea un co-activador de E2F-1, pensamos que en su ausencia la actividad de E2F-1 podría verse afectada. Para comprobar esta hipótesis, transfectamos fibroblastos inmortalizados de embriones *Parp-1^{-/-}*, *Parp-1^{+/+} Rb^{-/-}*, *Parp-1^{-/-} Rb^{-/-}* y *Parp-1^{+/+}* con el vector pE2F-Luc, que cuenta con un *enhancer* quimérico que contiene elementos de respuesta de E2F-1 y que controlan la transcripción del gen de la luciferasa (Uhrbom *et al.*, 2004). De esta manera podemos observar de manera directa la actividad transcripcional de E2F-1 en estos fibroblastos. Los resultados de este experimento se muestran en la **Figura 14**.

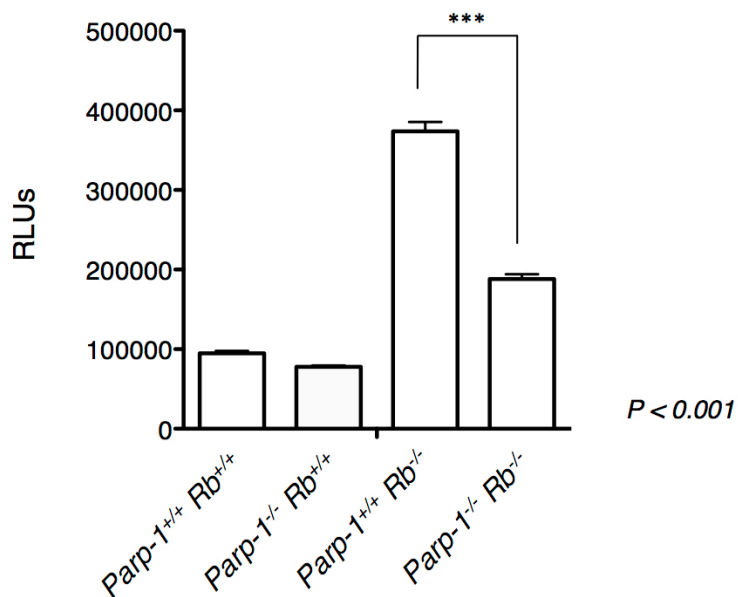


Figura 14.- Ensayo de la actividad luciferasa en fibroblastos embrionarios de ratones *Parp-1*^{+/+} *Rb*^{+/+}, *Parp-1*^{-/-} *Rb*^{+/+}, *Parp-1*^{-/-} *Rb*^{-/-} y *Parp-1*^{+/+} *Rb*^{-/-}. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante el test de comparación múltiple de Tukey, resultando significativamente diferentes en el caso de los genotipos *Parp-1*^{+/+} *Rb*^{-/-} y *Parp-1*^{-/-} *Rb*^{-/-} ($P < 0,001$).

De igual modo, quisimos comprobar si esta disminución de la actividad transcripcional de E2F-1 podría conseguirse usando inhibidores químicos de PARP-1. Para ello, seleccionamos varias moléculas con estas propiedades, tomando varios ejemplos representativos de las distintas generaciones de estos inhibidores. Dentro de los inhibidores clásicos, la 3-aminobenzamida (**Fig. 15, 1**) destaca por ser uno de los primeros análogos de la nicotinamida utilizados con este fin (Shall *et al.*, 1975). Dentro de la segunda generación encontramos a derivados de la benzoquinolina y benzoquinolinonas como es el caso de TiQ-A y PJ34 (**Fig. 15, 3 y 4** respectivamente), y quinazolinonas como NU1025 (**Fig. 15, 2**) el cual es conocido por ser el inhibidor de PARP-1 empleado en los estudios pioneros acerca de la letalidad sintética en tumores deficientes en BRCA1/2 (Farmer *et al.*, 2005; Bryant *et al.*, 2005). Así mismo, también incluimos una de los inhibidores de última generación y que ha demostrado su eficacia en diversos estudios de fase clínica y con distintos tipos tumorales como es el caso del veliparib (ABT-888) (Davar *et al.*, 2012; Iglesias *et al.*, 2014). Por último y para completar el panel de inhibidores, incluimos al gosipol (**Fig. 15, 6**), un compuesto de origen natural y con

capacidad para bloquear específicamente las interacciones proteína-proteína de PARP-1 mediadas por el dominio BRCT central, como es el caso de PARP-1 y E2F-1 (Na *et al.*, 2015). Las estructuras de estas moléculas aparecen ilustradas en la **Figura 15**, mostrada a continuación.

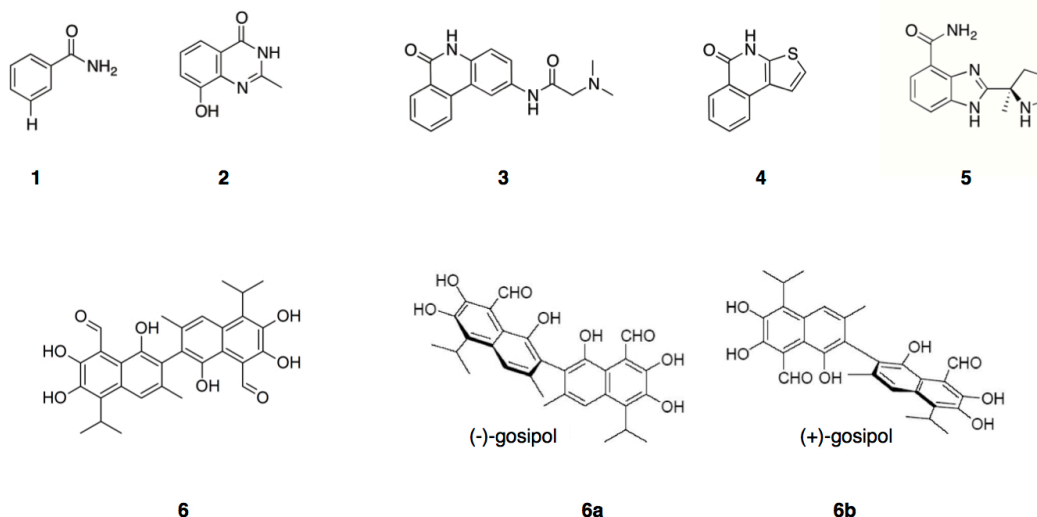


Figura 15.- Estructura de los inhibidores de PARP-1 y el gossipol, inhibidor de las interacciones proteína-proteína de PARP-1. El gossipol se obtiene de su fuente natural, el algodón, como una mezcla racémica de dos atropisómeros donde el isómero (-)-gossipol (**6a**) consigue interferir específicamente las interacciones proteína-proteína de PARP-1.

Una vez seleccionados los inhibidores, realizamos otro ensayo de actividad luciferasa en la que transfectamos células HEK293 que fueron transfectadas con el vector E2F-Luc. Tras ser transfectadas, las células se sincronizaron por el método de la doble timidina y una vez liberadas del arresto se trataron con los inhibidores arriba indicados. Algunos de estos compuestos presentan una pobre solubilidad en agua por lo que incluimos como control un grupo de células tratadas con su solvente que en este caso se trata de DMSO.

Tras registrar las respectivas actividades de la enzima luciferasa de cada uno de los grupos tratados éstos se normalizaron sus valores con respecto los de sus respectivos controles, tal y como se muestra en la **Figura**

16. Los valores de bioluminiscencia se corrigieron con la actividad beta-galactosidasa de cada grupo.

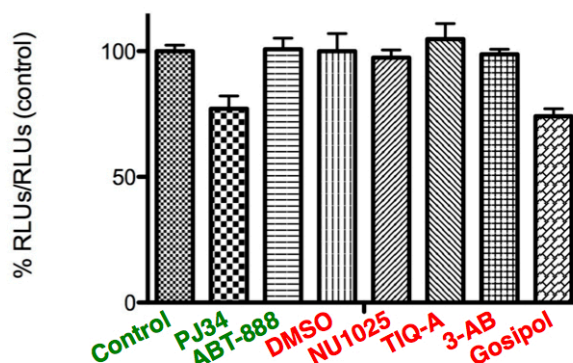


Figura 16.- Ensayo de actividad luciferasa de los inhibidores de PARP-1 en HEK293 transfectadas con el plásmido E2F-Luc. Se muestran los inhibidores resaltados en colores verde (agua) y rojo (DMSO) dependiendo del solvente utilizado y sobre los cuales se normalizaron sus respectivos resultados. Las células se sincronizaron previamente a los tratamientos con las dosis de cada compuesto que se indica en la sección de Materiales y Métodos.

Como se puede apreciar en estos resultados, en términos generales la inhibición enzimática de PARP-1 reduce la actividad transcripcional de E2F-1 de manera similar a la deficiencia de PARP-1 que veíamos en el anterior experimento. Dentro de los grupos experimentales, hallamos que PJ34 es posiblemente la molécula, dentro de los inhibidores clásicos de PARP-1, que consigue reducir en mayor medida esta transactivación mientras que las células tratadas con gosipol ven reducida esta actividad luciferasa en casi un 40% con respecto al control no tratado.

Para corroborar estos datos realizamos un ensayo de incorporación de 5-etinil-2'-deoxiuridina (EdU), mostrado en la **Figura 17**, que nos permita cuantificar la proliferación de las células tratadas con estos inhibidores y compararlas con células deficientes de PARP-1. Para ello una vez sembrados los fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) de genotipos *Parp-1^{+/+}* y *Parp-1^{-/-}*, y como paso previo al tratamiento y con los mismos inhibidores del experimento anterior las serodeprivamos para retenerlas en la interfase G₁/S. Una vez tratadas con la solución de tinción los núcleos de las células que hayan incorporado el análogo de timidina emitirán una fluorescencia roja. Así

mismo, estos núcleos se encuentran contrateñidos con Hoechst 33258 (bisbenzimidida) que nos permitirá estimar el porcentaje de núcleos apoptóticos.

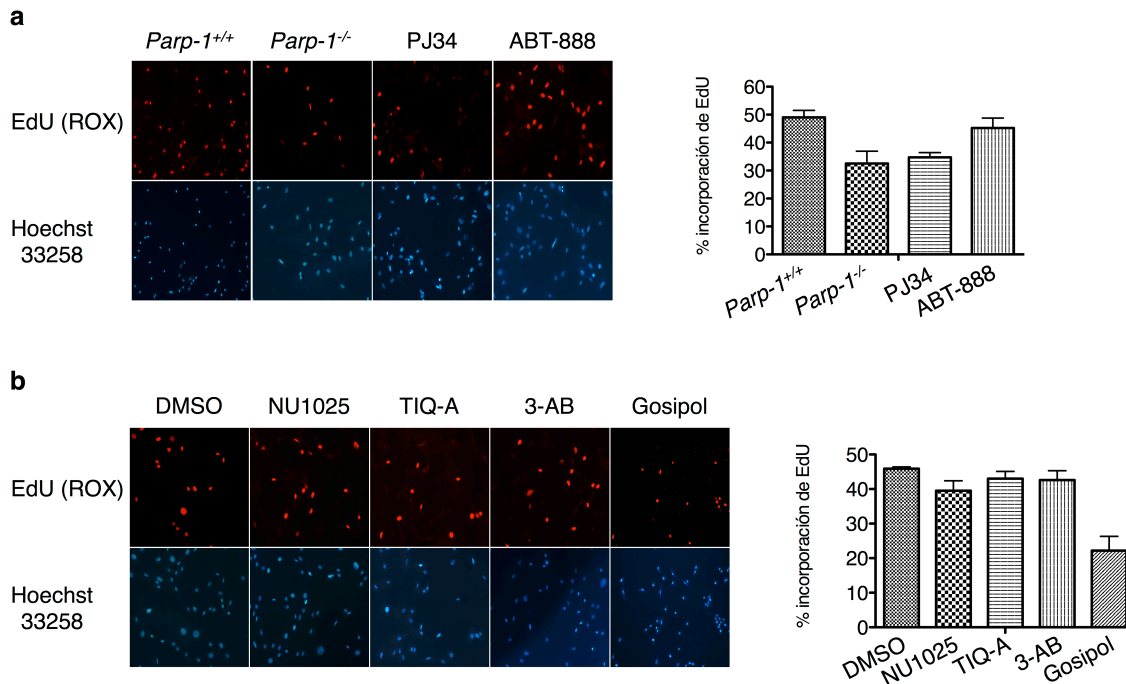


Figura 17.- Ensayo de incorporación de EdU en células tratadas con los inhibidores de PARP-1. Se contrateñieron los núcleos con Hoechst 33258 (bisbenzimidida); **a**, controles (*Parp-1^{+/+}* y *Parp-1^{-/-}*) e inhibidores disueltos en agua; **b**, células tratadas con DMSO (vehículo) e inhibidores disueltos en DMSO.

De nuevo, observamos una diferencia significativa en la proliferación de las células *Parp-1^{+/+}* y *Parp-1^{-/-}* lo que es coherente con el papel de PARP-1 como co-activador de E2F-1 en el inicio de la fase S. Así mismo, el tratamiento de las células *Parp-1^{+/+}*, tal y como se vio en el experimento de actividad luciferasa, reduce la proliferación celular y con mayor eficacia en el caso de las células tratadas con el inhibidor PJ34 y gosipol.

Tomados en conjunto, esta serie de experimentos nos demuestra que la deficiencia de PARP-1 reduce de manera significativa la actividad transcripcional debida a E2F-1 y la proliferación celular, lo cual se corresponde con la contribución que se le supone a PARP-1 como co-activador de este factor de transcripción. Además, gracias a la inhibición química de la actividad enzimática de PARP-1 se reproducen en cierta medida estos mismos efectos observados en células en las que esta proteína se encuentra ausente, mientras

que la inhibición específica de la interacción proteína-proteína, como en el caso del tratamiento con gopipol, parece tener un efecto todavía mayor.

Con el fin de comprobar si este efecto en la actividad transcripcional y proliferativa se corresponde con la localización subcelular de las proteínas, realizamos una co-transfección de vectores conteniendo las proteínas de fusión EGFP-PARP-1 y RFP-E2F-1 en células HEK293. Estas células fueron retenidas en la interfase G_1/S como paso previo a su liberación y tratamiento con los inhibidores PJ34 y gopipol. La **Figura 18** muestra imágenes de co-localización de ambas proteínas además de las fluorescencias debidas a cada proteína de fusión además de los núcleos contrateñidos con DAPI.

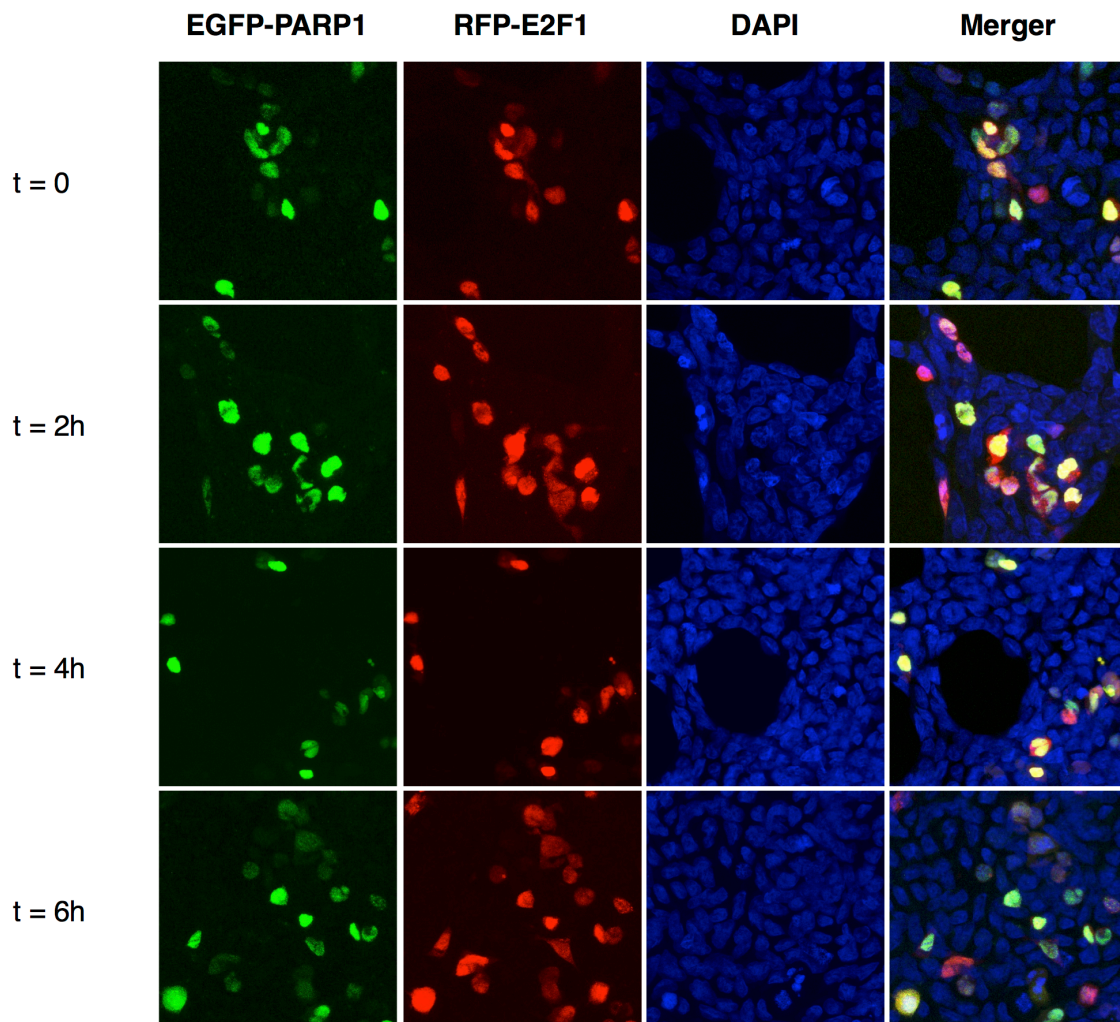


Figura 18.- Co-localización de EGFP-PARP-1 y RFP-E2F-1 en HEK293 a 0, 2, 4 y 6 horas tras el arresto en la interfase G_1/S . Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI. A la derecha se muestran los tres canales de fluorescencia superpuestos (63x).

Como se puede apreciar, la co-localización de ambas proteínas se sucede desde el momento en que se liberan los cultivos del arresto en la interfase G_1/S hasta prácticamente 6 horas después. La **Figura 19** ilustra mejor este fenómeno con imágenes a mayores aumentos en las que se puede apreciar la progresión desde la liberación del arresto en la interfase G_1/S .

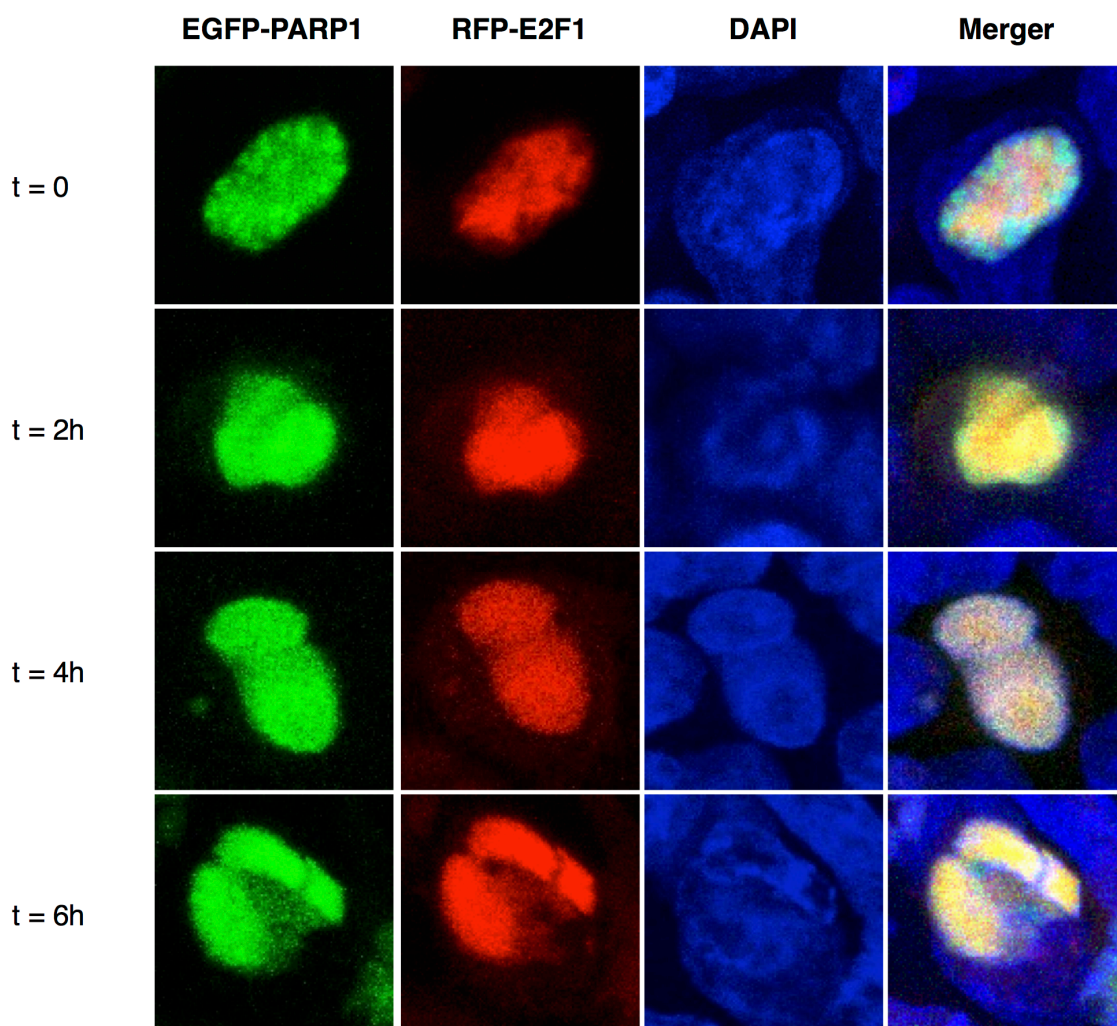


Figura 19.- Co-localización de EGFP-PARP-1 y RFP-E2F-1 en HEK293 a 0, 2, 4 y 6 horas tras el arresto en la interfase G_1/S . Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI. A la derecha se muestran los tres canales de fluorescencia superpuestos (100x).

Este mismo comportamiento no es que el observamos en las células tratadas con el inhibidor PJ34 en la que la localización subcelular de estas proteínas, en especial E2F-1, parece verse alterada. Como se puede apreciar en las imágenes de 4 y 6 horas, la intensidad de E2F-1 decrece de manera notable lo que hace pensar en la posibilidad de que la estabilidad del factor de

transcripción se vea afectada de alguna manera. En la siguiente página, la **Figura 20** muestra las imágenes de las células tratadas con este inhibidor.

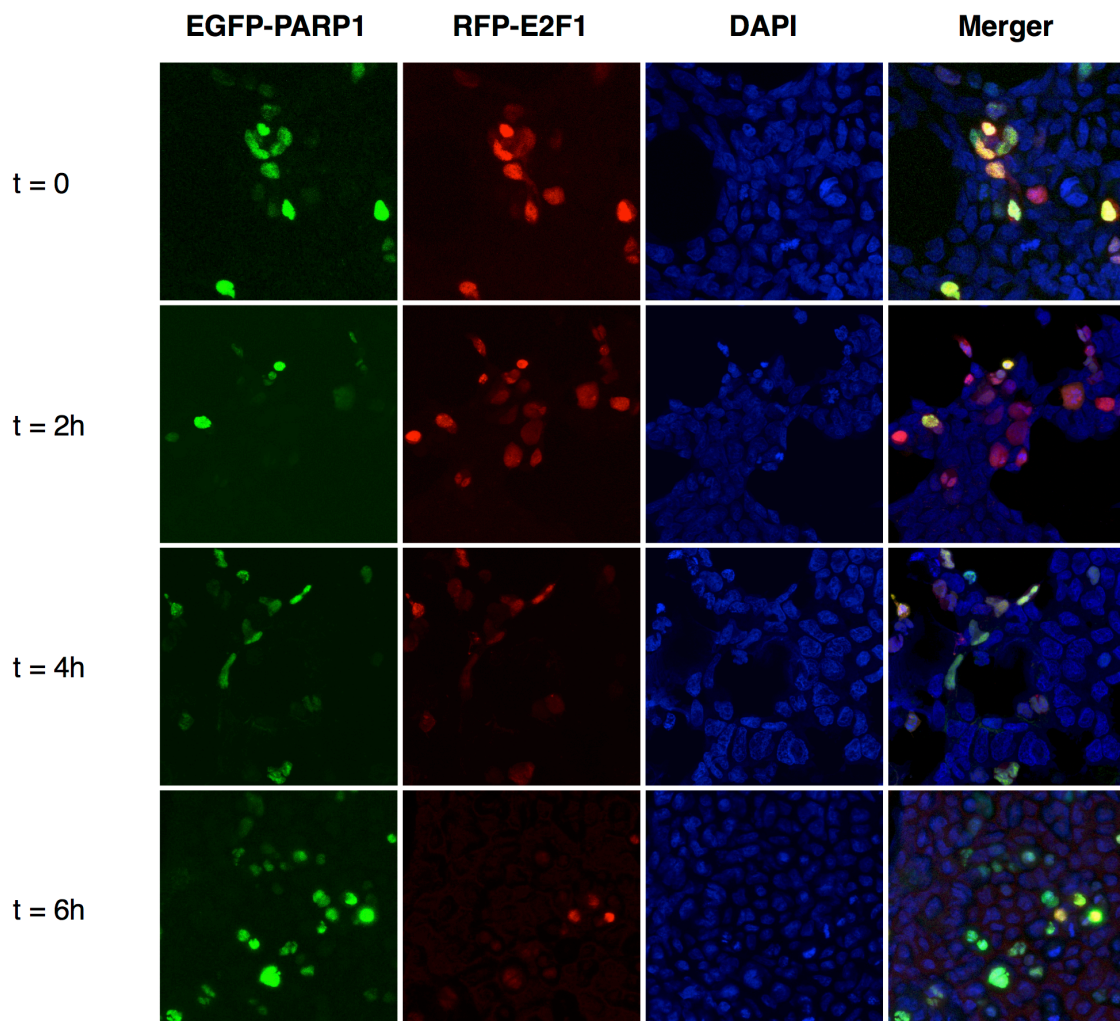


Figura 20.- Co-localización de EGFP-PARP-1 y RFP-E2F-1 en HEK293 a 0, 2, 4 y 6 horas tras el arresto en la interfase G_1/S y tratados con el inhibidor PJ34. Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI. A la derecha se muestran los tres canales de fluorescencia superpuestos (63x).

Por otra parte, no es el caso de las células tratadas con gosispol y su vehículo (DMSO). En el caso del DMSO (**Figura 21**), observamos que la coincidencia espacial de las fluorescencias de las proteínas de fusión apenas varía con respecto al control. Sin embargo, en el caso del gosispol, cuyas imágenes se muestran en la **Figura 22**, sólo a partir de las 4 horas de tratamiento parece haber un ligero efecto de deslocalización que parece afectar en mayor medida a PARP-1, aunque en ningún caso se presenta en igual manera que en el caso del inhibidor PJ34.

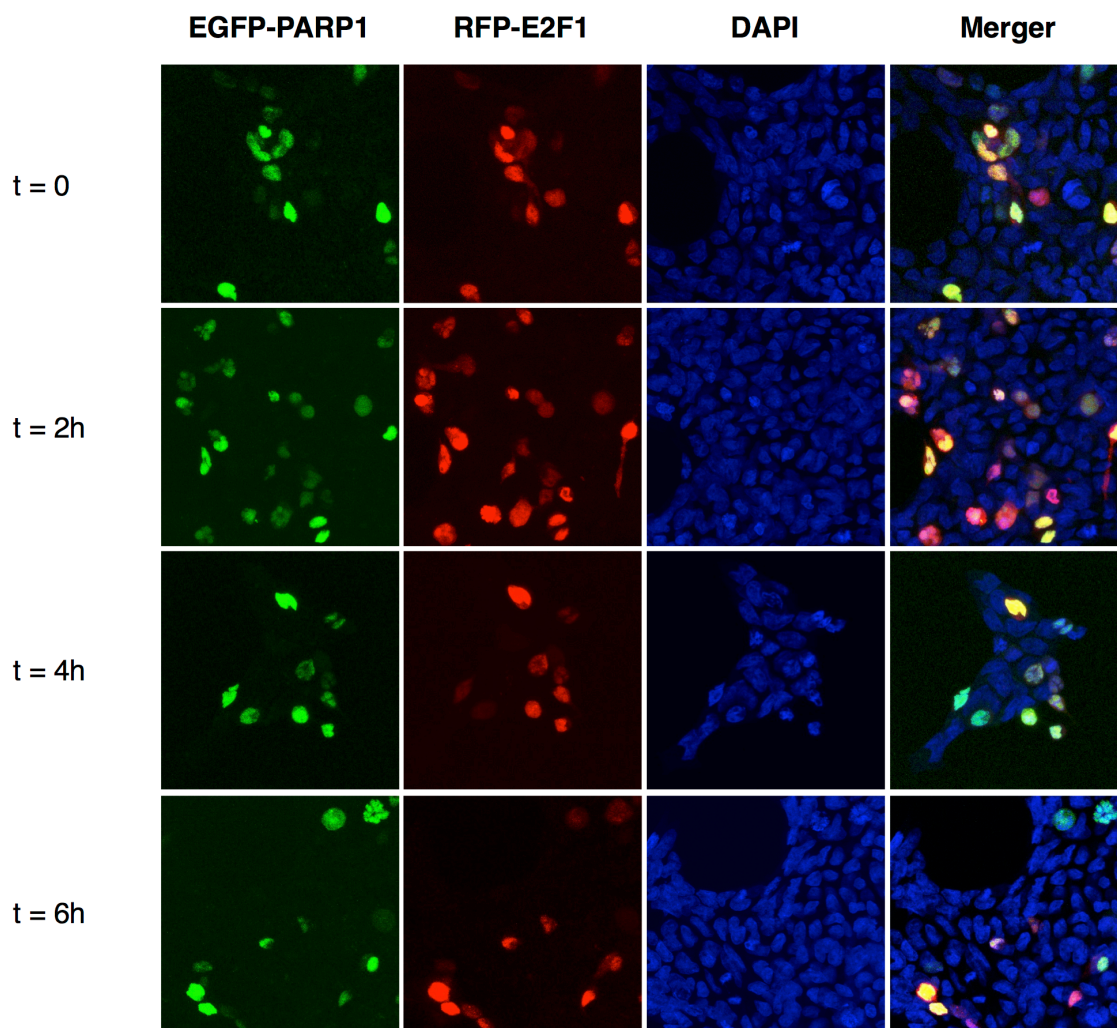


Figura 21.- Co-localización de EGFP-PARP-1 y RFP-E2F-1 en HEK293 a 0, 2, 4 y 6 horas tras el arresto en la interfase G₁/S y tratados con vehículo (DMSO). Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI. A la derecha se muestran los tres canales de fluorescencia superpuestos (63x)

Merece la pena tener en consideración otros efectos biológicos derivados del tratamiento con gosipol. Este compuesto es extraído de varias especies del género *Gossypium* y es usado como anticonceptivo masculino y antagonista de PAF (*Platelet Activating Factor*) (Wang *et al.*, 2009). No hay que olvidar posibles efectos indeseados derivados del tratamiento con esta molécula ya que gosipol es un mimético del dominio BH3 de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y como este tipo de inhibidores, es capaz de antagonizar la función de esta proteína al competir por sus sitios de unión, lo que puede desembocar en apoptosis celular (Oliver *et al.*, 2004; Chonghaile y Latai, 2009). Sin embargo, al igual que en las células tratadas con el vehículo (DMSO) no se observaron núcleos apoptóticos en las células tratadas con este inhibidor.

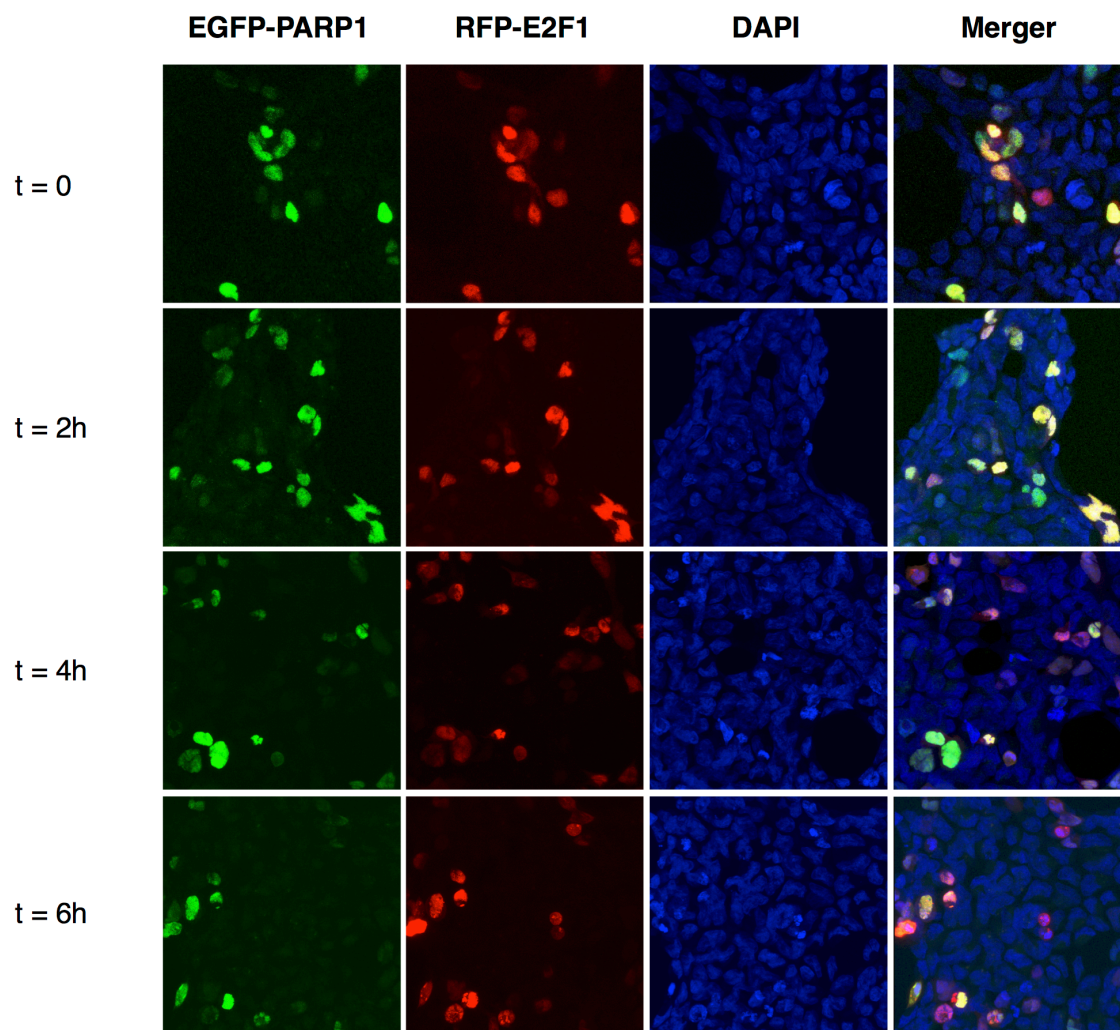


Figura 22.- Co-localización de EGFP-PARP-1 y RFP-E2F-1 en HEK293 a 0, 2, 4 y 6 horas tras el arresto en la interfase G₁/S y tratados con el inhibidor gossipol. Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI. A la derecha se muestran los tres canales de fluorescencia superpuestos (63x).

Tomando estos datos en conjunto, podemos ver un efecto en la interacción entre PARP-1 y E2F-1 por parte de PJ34 y en menor medida gossipol, que se corresponde con los ensayos funcionales en los que estos tratamientos reducen la proliferación y transactivación transcripcional de las células tratadas. Curiosamente, este efecto se produce después de sincronizar las células en la interfase G₁/S y liberarlas añadiendo los tratamientos con PJ34 y gossipol, en los que el PJ34 parece reducir la intensidad de la fluorescencia de la proteína de fusión RFP-E2F-1 lo que nos hace preguntarnos acerca de los posibles efectos de esta molécula sobre la estabilidad del factor de transcripción E2F-1.

Con el objetivo de intentar averiguar de manera más detallada el mecanismo molecular de este efecto, tratamos células que expresan estas proteínas de fusión con cicloheximida, que inhibe la síntesis proteica al bloquear la traducción del mRNA y observamos la estabilidad de la proteína analizando sus niveles a distintos tiempos que en nuestro caso abarcan desde el momento de liberación del arresto celular (tiempo 0) a las 2, 4 y 6 horas posteriores. Como se puede observar en la **Figura 23**, los niveles de E2F-1 varían muy ligeramente en los controles y las células tratadas con gosispol. Sin embargo, esta variación es algo más clara en los tiempos finales de las células tratadas con PJ34, lo cual sugeriría un posible efecto de esta molécula sobre la estabilidad de E2F-1.

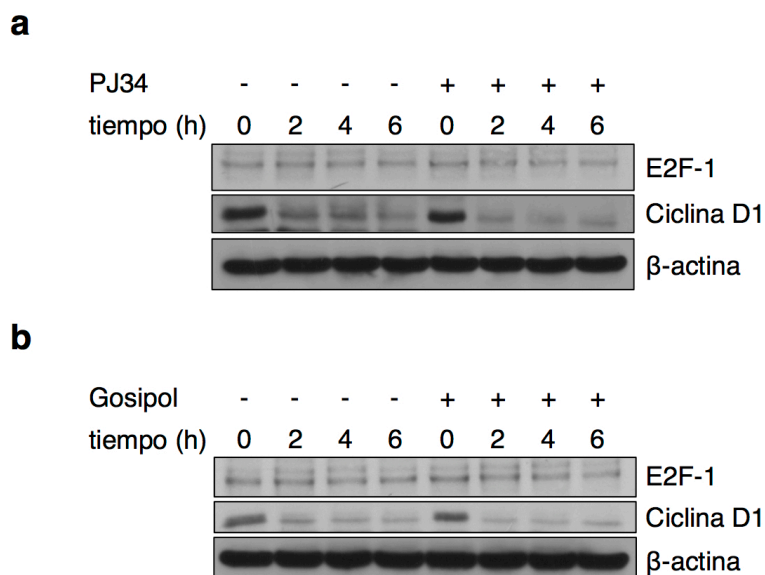


Figura 23.- a, inmunoblot de lisados de células control o tratadas con PJ34 (10 μ M) cuya traducción del mRNA ha sido bloqueada por medio del tratamiento con cicloheximida.; b, inmunoblot de lisados de células control (DMSO) o tratadas con gosispol (25 μ M) cuya traducción del mRNA ha sido bloqueada por medio del tratamiento con cicloheximida. Se muestran los niveles de ciclina D como control del tratamiento de cicloheximida y de beta-actina como control de carga.

Como mencionamos anteriormente, la interacción de PARP-1 y E2F-1 tiene lugar por medio del dominio central de PARP-1 que contiene un motivo BRCT. Este tipo de motivos se encuentran en multitud de proteínas y desempeñan un gran número de funciones biológicas funcionando como dominios aislados, como en el caso de PARP-1, o bien como parte de complejos homólogos o heterólogos. Como se descubrió al estudiar el motivo

BRCT de la proteína BRCA1 este tipo de dominios tiene una gran afinidad, aunque no de manera exclusiva, por proteínas fosforiladas (Yu *et al.*, 2003; Leung y Glover, 2011).

Es por ello que nos preguntamos si la interacción de E2F-1 con PARP-1 sucede a consecuencia de la fosforilación de esta proteína y si es así qué tipo de fosforesiduo, serina o treonina, es el portador de dicha modificación post-traducciona. Para ello estudiamos la estructura del dominio BRCT de PARP-1 en busca de otros BRCT que por la homología de su estructura pudieran proporcionarnos ciertas claves acerca del mecanismo de interacción. Curiosamente, en nuestra búsqueda por este homólogo estructural descubrimos que el sexto dominio BRCT (BRCT6) de la proteína TopBP1 presenta un relativamente alto porcentaje de identidad (25%) con el BRCT de PARP-1 (Yamane *et al.*, 1997). Lo que resultó aun más revelador es que TopBP1 no solo interacciona con PARP-1 por medio de sus respectivos BRCT formando un complejo homodimérico al que suelen tender este tipo de dominios, sino que también es capaz de interactuar con E2F-1 tras la fosforilación de la serina 31 por medio de ATM (Loeffler *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2003). Sin embargo, a diferencia de PARP-1 que co-activa a E2F-1, TopBP1 actúa como un represor de la actividad transcripcional de E2F-1 retrasando la entrada de la célula en la fase S. Si atendemos a sus funciones biológicas, TopBP1 es una proteína crítica para la replicación del DNA y tiende a localizarse en horquillas de replicación interrumpidas por el daño en el DNA donde suele formar parte de macrocomplejos de reparación junto con otras proteínas como Nbs1, BRCA1 o 53BP1. E2F-1 también forma parte de estos complejos atraído por TopBP1, pero con la función de potenciar el reclutamiento de otros factores implicados en la reparación por escisión de nucleótidos (Mäkinen *et al.*, 2001; Yamane *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2010).

Para comprobar si la interacción entre PARP-1 y E2F-1 se produce de manera similar a la de TopBP1 realizamos un ensayo luciferasa con fibroblastos *Parp-1^{+/+}* y *Parp-1^{-/-}* a los que transfectamos E2F-1 o los mutantes E2F-1^{S31D} y E2F-1^{S31A} (**Figura 24a**) En estos mutantes la serina 31 ha sido

sustituida, bien por un ácido aspártico que mimetiza un residuo fosforilado y por tanto reproduce una interacción constitutiva con TopBP1, o bien una alanina lo que impide la fosforilación del residuo e impide la interacción. Como se puede observar en la **Figura 24a-b**, mientras que los fibroblastos *Parp-1^{+/+}* demuestran un comportamiento similar al descrito en la literatura, en el caso de los fibroblastos deficientes de PARP-1 la mutación del residuo Ser31 no tiene un efecto tan profundo sobre la actividad transcripcional de E2F-1. Esto podría indicarnos que la deficiencia de PARP-1 supone un impedimento para la actividad transcripcional de E2F-1 mucho mayor que la interacción con TopBP1 o bien que ambas interacciones están relacionadas de alguna manera.

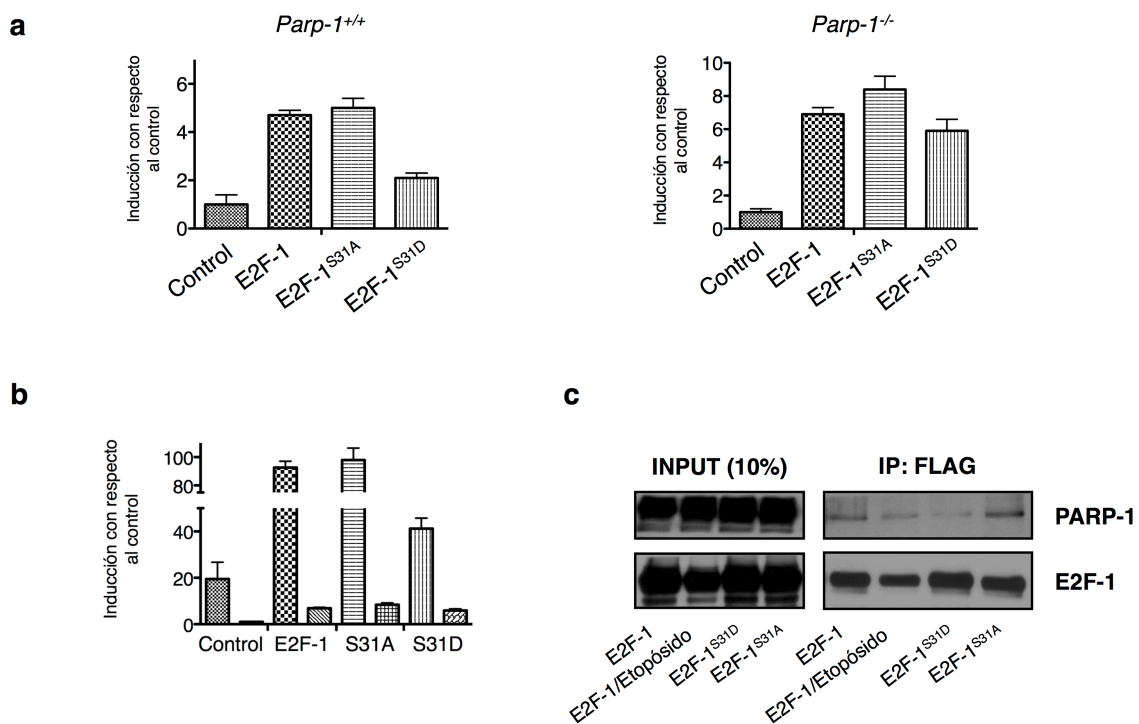


Figura 24.- **a**, ensayo de actividad luciferasa de las células *Parp-1^{+/+}* (panel izquierdo) y *Parp-1^{-/-}* (panel derecho); **b**, actividad luciferasa de las células *Parp-1^{+/+}* (derecha) y *Parp-1^{-/-}* (izquierda) representadas de manera conjunta; **c**, inmunoprecipitación de E2F-1 y sus mutantes S31A y S31D, con el anticuerpo monoclonal anti-FLAG (F1804, Sigma-Aldrich). La detección de PARP-1 y E2F-1 se realizó con los respectivos anticuerpos detallados en la sección de Materiales y métodos.

Además, quisimos corroborar estos resultados con una inmunoprecipitación de E2F-1. Para ello, se transfectaron MEFs con E2F-1 o sus mutantes y se sincronizaron por serodeprivación. Además, en esta ocasión

se incluyó también un grupo experimental con células sobreexpresando E2F-1 *wild-type* tratadas con etopósido de manera que se induce la respuesta a daño al DNA (DDR) y por tanto la fosforilación de E2F-1 en la serina 31 por parte de ATM. Como se puede observar en la **Figura 24c**, tras la inmunoprecipitación de E2F-1 y sus variantes observamos principalmente la presencia de PARP-1 en el control no tratado y en el que sobreexpresa el mutante S31A, donde la interacción E2F-1 y TopBP1 está abolida. En cuanto a al mutante S31D la presencia de PARP-1 es mucho menos intensa que en el control, y lo mismo sucede en el caso del tratamiento con etopósido, en la que la interacción de PARP-1 con E2F-1 parece reducirse.

2. Estudio de la interacción PARP-1/E2F-1 durante el desarrollo embrionario.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en cultivos celulares que demuestran la importancia de PARP-1 para la actividad de E2F-1, el siguiente paso lógico era comprobar si esta misma relevancia se producía en un contexto *in vivo*. Para ello decidimos utilizar varias cepas de ratones modificados genéticamente, y más concretamente los ratones *knock-out* de PARP-1 y Rb respectivamente.

En cuanto al ratón *knock-out* de retinoblastoma, la característica fenotípica más destacable es la letalidad embrionaria que se produce en torno al estadio E13,5, lo que impide contar con individuos *Rb^{-/-}* adultos. Esta letalidad embrionaria se manifiesta principalmente por la aparición de apoptosis masiva en el Sistema Nervioso Central (SNC) y numerosas deficiencias en la diferenciación y enucleación de las células sanguíneas (Clarke *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1994). La principal causa de este fenotipo es la hiperactivación de E2F-1 producida por la ausencia de retinoblastoma, y que en los tejidos extraembrionarios se manifiesta de manera prominente en la placenta, afectando a la estructura del laberinto donde se produce el intercambio gaseoso que sumado a los defectos ya

enumerados conllevan la muerte prematura del embrión (Jacks *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 2003).

Este fenotipo se consigue rescatar parcialmente por medio de la delección conjunta de E2F-1 y pRb, tal y como describieron Yamasaki y colegas. Según estos autores, los ratones *E2f-1^{-/-} Rb^{-/-}* aunque de igual manera que los ratones deficientes de retinoblastoma no consiguen superar la fase embrionaria su letalidad es retrasada hasta el estadio E17,0. Así mismo, el estudio de la histología de los tejidos placentarios de los ratones doble *knock-out* revela una morfología más benigna, en la que se reduce el número de células gigantes del trofoectodermo que invaden el interior la placenta, a la vez que se produce un aumento de la proporción de eritrocitos enucleados (Tsai *et al.*, 1998; Yamasaki *et al.*, 1998).

Por ello, decidimos comprobar si este rescate parcial podría ocurrir de manera similar en el caso de los individuos *Parp-1^{-/-} Rb^{-/-}*, considerando la ausencia de PARP-1 como modelo de hipofunción de E2F-1, y para tal efecto cruzamos ambos genotipos y examinamos los embriones a diferentes etapas del desarrollo, empezando en el estadio E13,5. Los datos de viabilidad de los embriones de cada genotipo aparecen recogidos en la **Tabla 7**.

	<i>Parp-1^{+/+} Rb^{+/+}</i>	<i>Parp-1^{-/-} Rb^{+/+}</i>	<i>Parp-1^{+/+} Rb^{+/-}</i>	<i>Parp-1^{+/+} Rb^{-/-}</i>	<i>Parp-1^{-/-} Rb^{+/-}</i>	<i>Parp-1^{-/-} Rb^{-/-}</i>
E13,5	9(0)	9(0)	19(0)	27(4)	22(0)	14(0)
E14,5	N/A	N/A	N/A	5(3)	N/A	N/A
E15,5	N/A	14(0)	N/A	6(6)	16(0)	12(3)
E16,5	N/A	7(0)	N/A	N/A	13(0)	5(3)
E17,5	N/A	2(0)	N/A	N/A	2(0)	3(3)
E18,5	N/A	14(0)	N/A	N/A	24(0)	5(5)

Embriones totales (embriones **no viables**)

Tabla 7.- Relación de embriones de los distintos genotipos examinados. Los ratones se consideraron viables por la observación del latido cardíaco. Los ratones no viables se indican entre paréntesis.

Como se puede observar en los datos mostrados en la tabla, la viabilidad de los individuos *Parp-1^{-/-} Rb^{-/-}* se extiende como máximo hasta el día E16,5, lo que hace pensar que la letalidad embrionaria de este genotipo se

produce entre los estadios E15,5 y E16,5, lo que supondría un retraso con respecto al embrión *Rb*^{-/-} de tres días acercándolo al fenotipo del embrión *E2f-1*^{-/-} *Rb*^{-/-}. Si prestamos atención al estado de los embriones (**Figura 25**), observamos que los individuos *Parp-1*^{-/-} *Rb*^{-/-} demuestran una morfología muy similar a la de los individuos *Parp-1*^{+/+} y *Parp-1*^{-/-}, que son completamente viables. Es destacable también el alto grado de irrigación vascular de estos ratones en estados avanzados del desarrollo como es el caso de E16,5 e incluso en E17,5, donde no se registró ningún doble *knock-out* viable, en que la integridad del embrión además de la coloración y morfología de los órganos internos demuestra que la muerte del embrión ha sucedido de manera muy reciente.

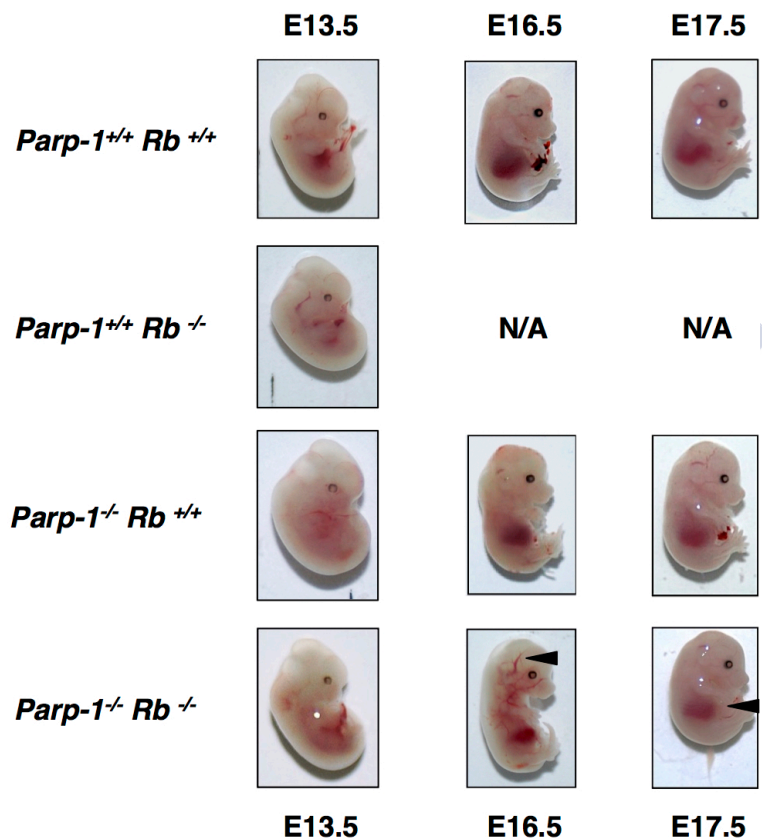


Figura 25.- Aspecto macroscópico de los distintos genotipos examinados en los estadios E13,5, E16,5 y E17,5. Las flechas sólidas indican la vascularización de los embriones *PARP*^{-/-} *RB*^{-/-} a E16,5 (viable) y E17,5 (no viable).

Si atendemos a las características histológicas de los embriones de cada genotipo en el estadio E13,5 podemos observar, tal y como nos muestra la **Figura 26**, que la deficiencia de retinoblastoma en el desarrollo produce

deficiencias severas principalmente en el tejido hepático como consecuencia de una apoptosis masiva en las células de este tejido, y que en nuestro caso se evidencia por el marcaje acusado de caspasa 3 activada. Curiosamente, en el ratón *Parp-1^{+/+} Rb^{-/-}* esta apoptosis masiva no sólo se manifiesta sino que las células del hígado del ratón proliferan de manera normal como en el caso de los ratones *Parp-1^{+/+} Rb^{+/+}* y *Parp-1^{-/-} Rb^{+/+}*, en los que tampoco se aprecian signos de apoptosis.

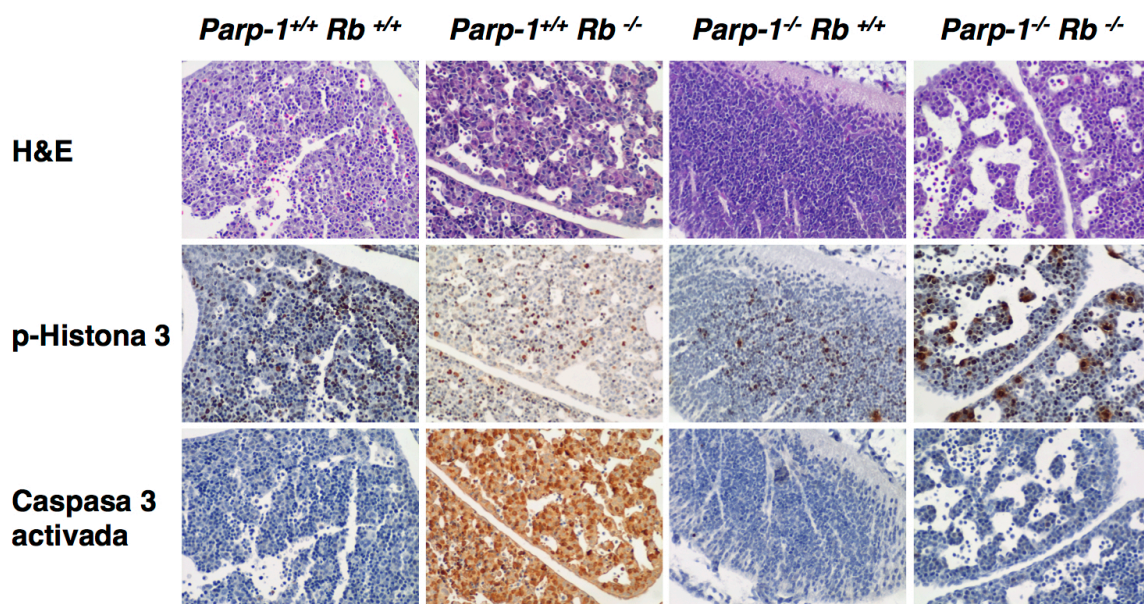


Figura 26.- Cortes histológicos de los tejidos hepáticos de los embriones de ratones de genotipo *Parp-1^{-/-}*, *Parp-1^{+/+} Rb^{-/-}*, *Parp-1^{-/-} Rb^{+/+}* y *Parp-1^{+/+}* en el estadio E13.5. Los marcadores histológicos incluyen la histona H3 fosforilada (proliferación), y la caspasa 3 activada (apoptosis).

De igual manera, si nos fijamos en los tejidos placentarios (**Figura 27**) de los ratones *Parp-1^{+/+} Rb^{-/-}*, la ausencia de retinoblastoma tiene como consecuencia la excesiva proliferación de las células del trofoblasto haciendo que la placenta pierda su aspecto poroso (Wu *et al.*, 2003). Este tipo de defectos también tienen lugar aunque en un grado menor en el caso de los ratones *Parp-1^{-/-} Rb^{-/-}*. Además, si atendemos a los marcadores inmunohistoquímicos (histona H3 fosforilada y caspasa 3 activada), se constata la ausencia de apoptosis en las placentas de los ratones *Parp-1^{-/-}* y *Parp-1^{+/+}* y muy baja o nula en el caso de los *Parp-1^{-/-} Rb^{-/-}*.

En contraposición, el tejido placentario de los ratones *Parp-1^{+/+} Rb^{-/-}* sí presenta una apoptosis moderada aunque no en la extensión del tejido hepático como se mostraba en la figura anterior.

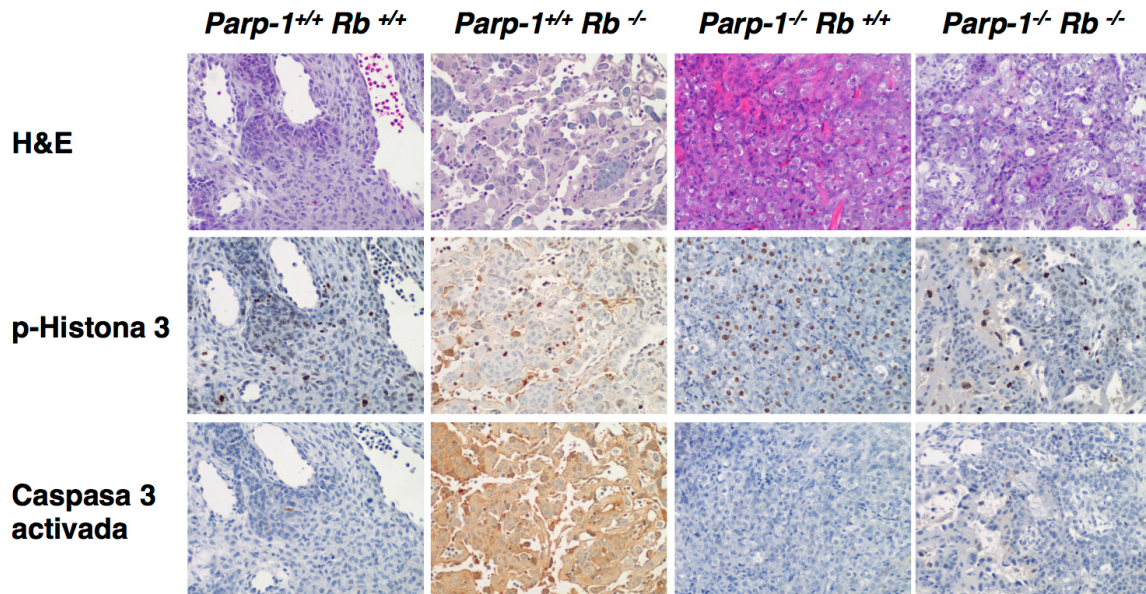


Figura 27.- Cortes histológicos de los tejidos placentarios de los embriones de ratones de genotipo *Parp-1^{-/-}*, *Parp-1^{+/+} Rb^{-/-}*, *Parp-1^{-/-} Rb^{-/-}* y *Parp-1^{+/+}* en el estadio E13,5. Los marcadores histológicos incluyen la histona H3 fosforilada (proliferación), y la caspasa 3 activada (apoptosis).

En cuanto al estado de diferenciación de los eritrocitos, las extensiones de sangre fetal periférica muestran un déficit en el porcentaje de eritrocitos enucleados (RCBs). Como se puede apreciar en el panel derecho de la **Figura 28**, la ocurrencia de eritrocitos enucleados es significativamente mayor en la sangre periférica obtenida del cordón umbilical de los embriones *Parp-1^{-/-} Rb^{-/-}* que la de los embriones deficientes en retinoblastoma, lo cual ocurre de manera similar en el caso del embrión doble *knock-out E2f-1^{-/-} Rb^{-/-}* (Tsai *et al.*, 1998).

Como se puede apreciar también en los insertos de las imágenes, la morfología de los eritrocitos en el caso del genotipo *Parp-1^{+/+} Rb^{-/-}* conservan en su mayoría el núcleo con un bajo porcentaje de células enucleadas. Esta situación parece revertirse al menos de manera parcial en el caso del genotipo *Parp-1^{-/-} Rb^{-/-}* con una mayor proporción de RCBs o eritrocitos maduros.

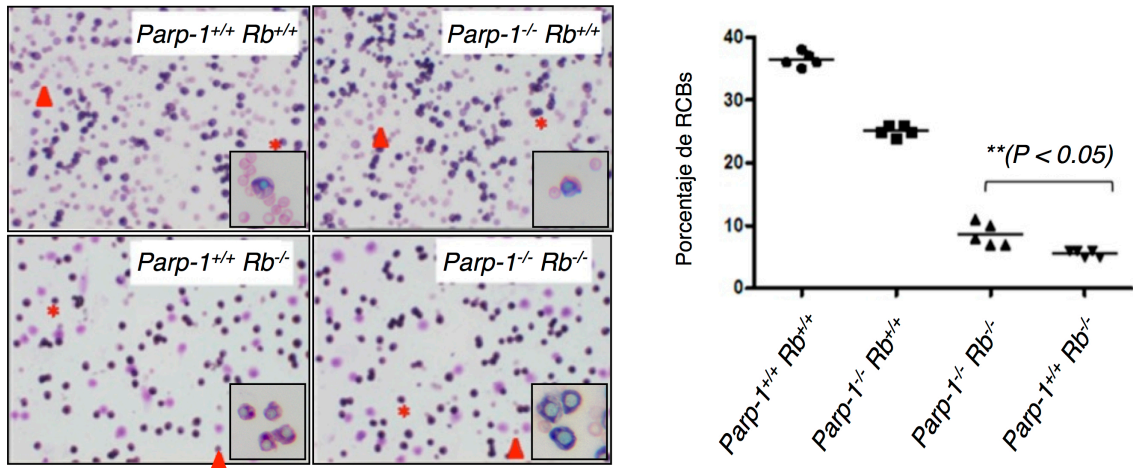


Figura 28.- Extensiones de sangre periférica de embriones E13,5 teñidas con Wright-Giemsa ($n = 6$). En ellas se muestran eritrocitos nucleados (asteriscos) y eritrocitos enucleados (RCBs) (flechas). En ellas se observa un aumento significativo (test T de Student) en el porcentaje de eritrocitos enucleados en los embriones $Parp-1^{-/-} Rb^{-/-}$ con respecto a los embriones $Rb^{-/-}$. En los insertos se muestran las diferencias entre los fibroblastos ortocromáticos (presentan núcleo) y los RCBs.

Las necropsias de ratones $Rb^{+/-}$ a partir de los ocho meses de edad revelan un aumento del tamaño de la hipófisis (**Fig. 29a**). Al ser analizadas se observó que presentaban un adenoma del lóbulo intermedio, en el que se produce la pérdida del alelo *wild-type* de retinoblastoma (Jacks *et al.*, 1992; Hu *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1994). Aunque en el ratón $Parp-1^{-/-} Rb^{+/-}$ también se reproduce este adenoma hipofisario, el porcentaje de ratones afectados es menor con el 77,8% (14/18) de individuos afectados frente al 92,3% (12/13) de casos de ratones $Rb^{+/-}$ (**Figura 29c**).

Como dato complementario, el análisis de los tamaños de las masas tumorales recogidas revela una diferencia, aunque no significativa, de las medias de los genotipos $Parp-1^{-/-} Rb^{+/-}$ y $Parp-1^{+/+} Rb^{+/-}$, mientras que en los individuos *wild-type* o $Parp-1^{-/-}$ no se registró ningún caso de adenoma hipofisario (**Figura 29b**). Asimismo, la supervivencia media de los ratones de ambos genotipos es similar y muy cercana a los 12 meses en ambos casos (**Figura 29c**), lo cual es cualitativamente distinto del caso de los ratones $E2f-1^{-/-} Rb^{+/-}$ cuya esperanza de vida aumentaba de manera significativa con respecto a los individuos $Rb^{-/-}$ (Yamasaki *et al.*, 1998).

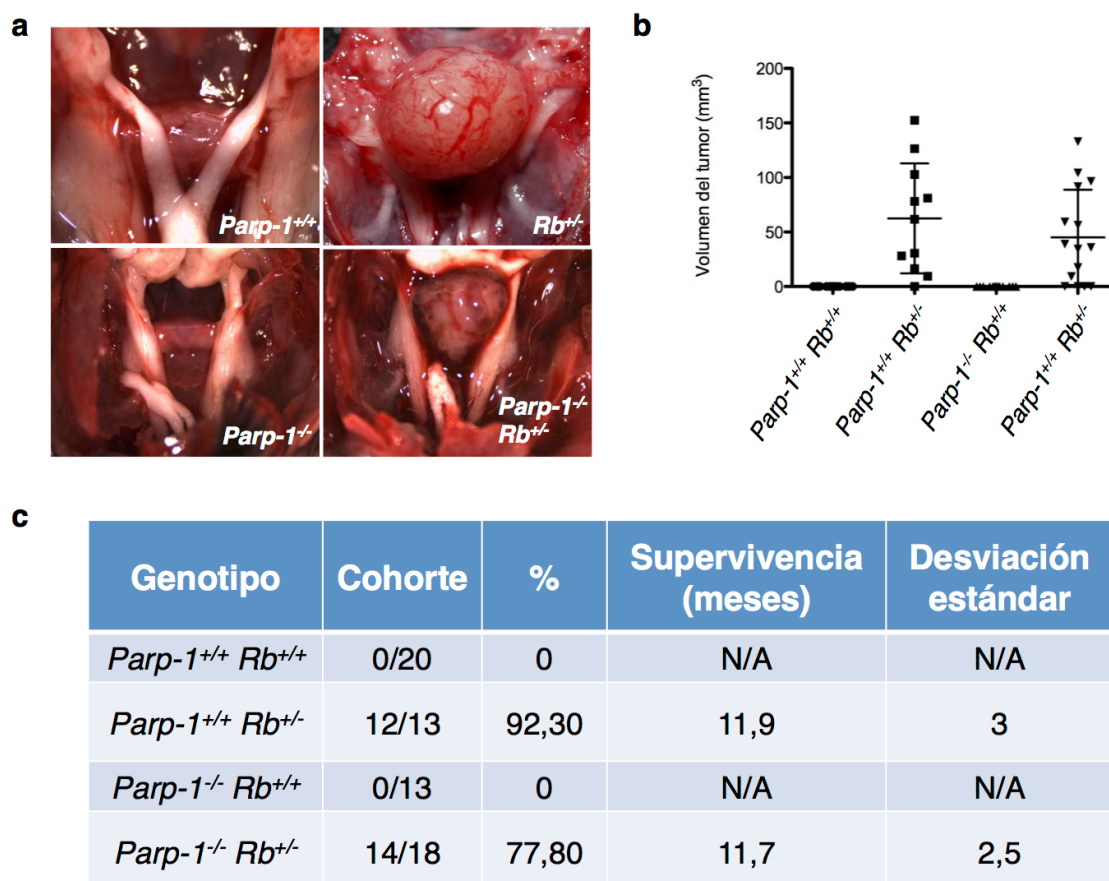


Figura 29.- a, imágenes de los adenomas hipofisarios recogidos en los ratones de cada genotipo; b, análisis de los volúmenes obtenidos en las necropsias; c, porcentaje de supervivencia y esperanza de vida media de cada genotipo. Todos los ratones fueron sacrificados en condiciones similares de estado de salud y capacidades motoras.

El análisis histológico de los tejidos de los distintos genotipos no reveló grandes diferencias en la patología, la cual se muestra en la **Figura 30**. Mientras que los cortes teñidos con hematoxilina y eosina revelaron tejidos con una apariencia normal y vascularizados, en el caso de las hipófisis de los individuos *Parp-1^{+/+} Rb^{+/+}* y *Parp-1^{-/-} Rb^{+/+}*, los marcajes con caspasa-3 activada (apoptosis) y histona H3 fosforilada (proliferación) de los adenomas obtenidos de los ratones *Parp-1^{-/-} Rb^{+/-}* y *Parp-1^{+/+} Rb^{+/-}* fueron positivos en células dispersas, fundamentalmente en la periferia de nidos lo cual se corresponde con este tipo de tumores endocrinos. Por ello no se encontraron diferencias significativas entre los adenomas *Parp-1^{-/-} Rb^{+/-}* y *Parp-1^{+/+} Rb^{+/-}* entre marcadores o casos.

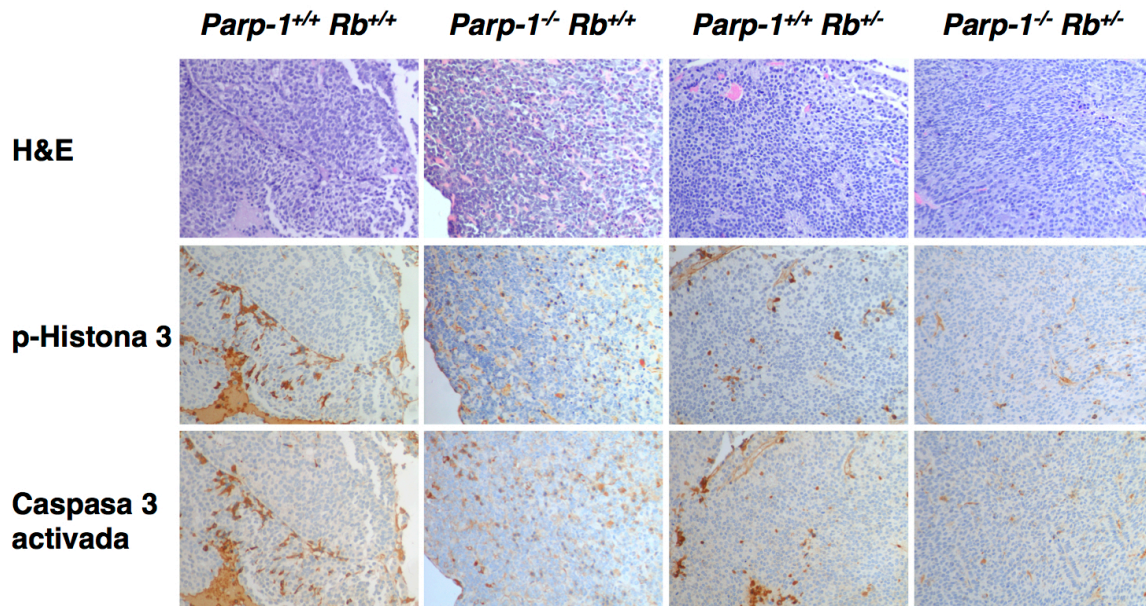


Figura 30.- Análisis histopatológico de los tejidos hipofisarios de los distintos genotipos. Las hipófisis de ratones *Parp-1^{+/+}* y *Parp-1^{-/-}* no muestran ningún tipo de alteración. Sin embargo, en los casos de los adenomas de los ratones *Rb^{+/-}* y *Parp-1^{-/-} Rb^{+/-}* no se detectaron diferencias significativas entre marcadores o casos.

Tomando todos estos datos en conjunto, observamos que aunque no se rescatan en su totalidad, la delección de PARP-1 suaviza los defectos en etapas del desarrollo asociadas a la ausencia de retinoblastoma de una manera similar observada en los embriones *E2f-1^{-/-} Rb^{-/-}* (Tsai *et al.*, 1998; Yamasaki *et al.*, 1998). Estos efectos deletéreos incluyen la letalidad embrionaria en torno al estadio E13,5 asociada al genotipo *Rb^{-/-}* que en el caso de *Parp-1^{-/-} Rb^{-/-}* ocurre entre E15,5 y E16,5, además de apoptosis masiva en el SNC y el hígado fetal que también parecen remitir al menos de manera parcial. En cuanto al incremento de la incidencia de tumores en individuos adultos *Rb^{+/-}*, especialmente en determinados tipos de cáncer tales como tumores pituitarios y tiroideos, son también comunes en los ratones *Parp-1^{-/-} Rb^{-/-}* registrándose un ligero descenso en el porcentaje de individuos afectados con respecto al ratón *Rb^{-/-}*, aunque las características anatomopatológicas de los adenomas no parecen diferir de manera significativa entre ambos grupos.

Todo ello nos hace pensar que la deficiencia de PARP-1 en un contexto *in vivo* tiene un efecto importante sobre la actividad de E2F-1 durante el

desarrollo embrionario similar al que hemos observado en cultivos celulares en los que se demuestra su papel como co-activador de E2F-1.

3. Estudio de la interacción PARP-1/E2F-1 en un modelo de oncogénesis.

Como último paso en nuestro estudio de la interacción PARP-1/E2F-1, nos propusimos estudiar los efectos que ésta podría desempeñar en un contexto de oncogénesis. Para ello quisimos aprovecharnos de un modelo de gliomagénesis que nuestro grupo ha desarrollado y caracterizado basado en la inactivación de un supresor de tumores y la ganancia de función de un oncogén (Seoane *et al.*, 2008). En nuestro modelo, el supresor de tumores inactivado es retinoblastoma, que como ya hemos mencionado su delección es la causa de numerosas aberraciones del ciclo celular originadas principalmente por el comportamiento descontrolado de E2F-1. Precisamente, este hecho convierte a este modelo en un excelente banco de pruebas para estudiar los efectos de PARP-1 en un contexto de hiperactivación del factor E2F-1.

3.1. Inhibidores de PARP-1

Como ya hemos publicado anteriormente y detallamos en la sección de materiales y métodos, obtenemos los astrocitos primarios a partir de neonatos P3 de genotipos *Parp-1*^{+/+} *Rb*^{flox/flox} y *Parp-1*^{-/-} *Rb*^{flox/flox} en los que introducimos por medio de transducciones retrovirales los genes de la recombinasa CRE y la isoforma constitutivamente activa del oncogén Ras HRas^{V12}. La recombinasa CRE reconoce las secuencias de recombinación *loxP*, que en el caso del ratón condicional *Rb*^{flox/flox} flanquean el exón 19 del gen de retinoblastoma. De esta forma conseguimos reproducir tanto la hiperregulación de receptores de factores de crecimiento como EGFR o FGFR observada en glioblastomas producida por la sobreexpresión de Ras oncogénico, como la desregulación del ciclo celular mediante la inactivación de la proteína Rb.

Sin embargo, no sólo quisimos comparar la delección genética de PARP-1 sino que al igual que en los ensayos de actividad transcripcional, utilizamos varios inhibidores de PARP-1 para estudiar el efecto que cada uno de ellos pudiese tener sobre este tipo celular. Como se observa en la **Figura 31a**, los astrocitos *Parp-1^{+/+} cRb^{-/-} HRas^{V12}* presentan diversos cambios morfológicos como numerosas prolongaciones citoplasmáticas, gran heterogeneidad en su forma y tamaño, además de la pérdida de la inhibición por contacto, que como ya habíamos descrito anteriormente son síntomas de un fenotipo transformado. Por su parte, los astrocitos *Parp-1^{-/-} cRb^{-/-} HRas^{V12}* demuestran al menos en gran medida estas mismas características pero aparentemente en un grado menor, sobre todo en cuanto a su densidad celular. Algo similar ocurre en términos generales con los astrocitos *Parp-1^{+/+} cRb^{-/-} HRas^{V12}* tratados con los inhibidores y en especial en el caso de PJ34, en los que el crecimiento se ha visto retrasado, tal y como se observa en la curva de crecimiento de todos los grupos experimentales durante 7 días. (**Fig. 31b**).

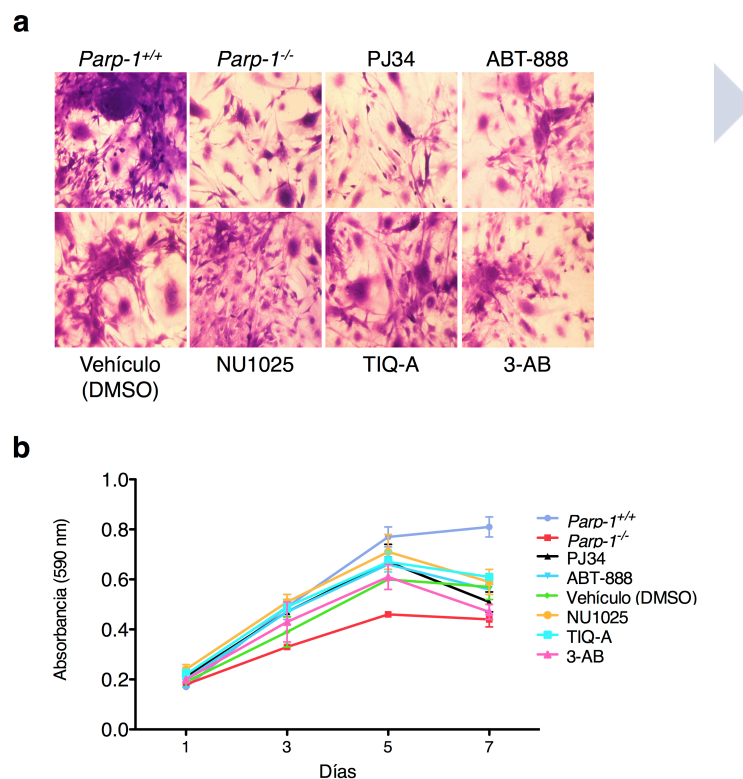


Figura 31.- a, morfología de los astrocitos *Parp-1^{-/-} cRb^{-/-} HRas^{V12}* y *Parp-1^{+/+} cRb^{-/-} HRas^{V12}* control y con los diferentes tratamientos. Cada experimento se repitió tres veces al menos; **b**, curva de proliferación de los grupos experimentales.

Quisimos además comprobar si el efecto que tienen los inhibidores de PARP-1 sobre la proliferación celular podría tener su reflejo en la senescencia inducida por oncogenes (OIS). Para ello, mediante un ensayo de la actividad SA- β -galactosidasa (**Figura 32a**) cuantificamos el número de células senescentes de cada grupo experimental. Teniendo en cuenta los datos de proliferación, observamos que el grupo tratado con PJ34, y NU1025 en menor medida, presentaron la mayor proporción de células senescentes, lo cual explicaría su proliferación reducida en comparación con el resto de grupos experimentales. Curiosamente, en el caso de los astrocitos *Parp-1*^{-/-} no observamos ningún incremento de la senescencia, lo que quizás tenga su explicación en algún fenómeno adaptativo producido por la ausencia crónica de PARP-1. Por el contrario, no se registró ningún aumento significativo en los niveles de apoptosis (**Figura 32b**).

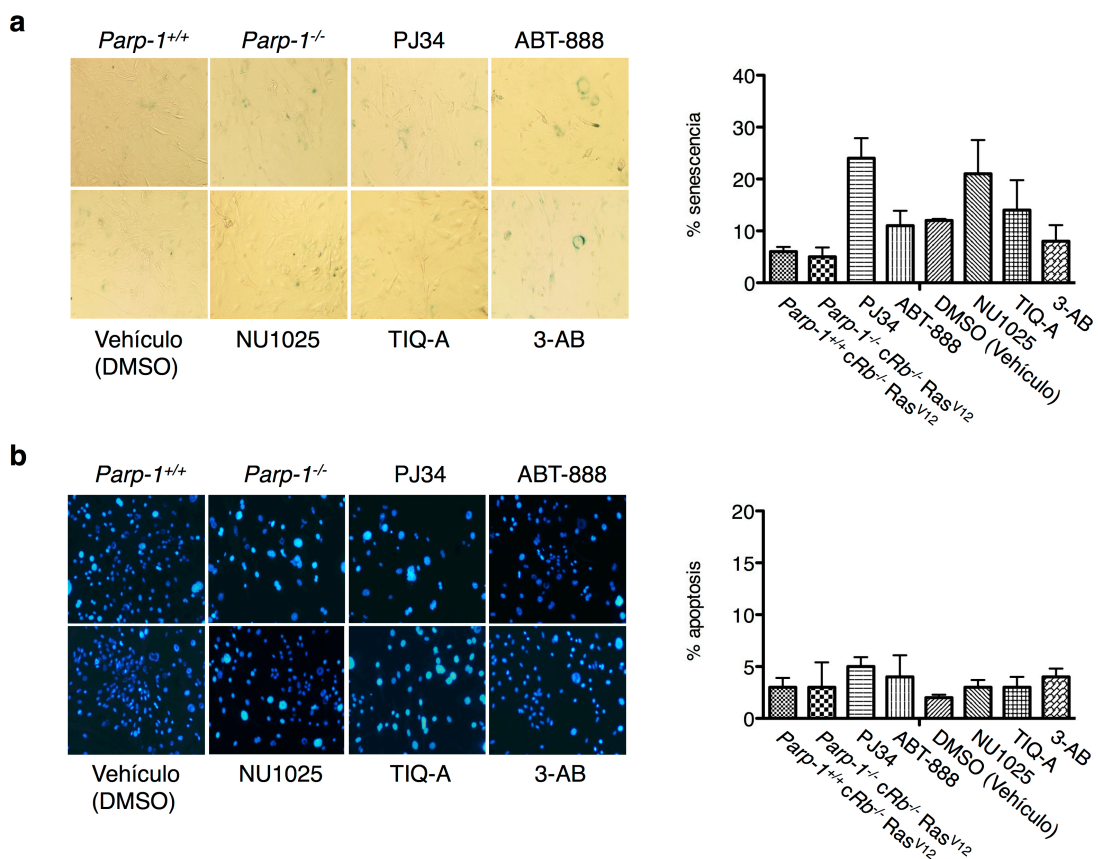


Figura 32.- a, ensayo de senescencia por cuantificación de la actividad SA- β -galactosidasa y fotografías representativas de los grupos experimentales; **b**, cuantificación de núcleos apoptóticos (Hoechst 33258) y microfotografías representativas de los grupos experimentales. Cada experimento se repitió tres veces al menos.

Otra característica morfológica que es indicativa de transformación celular en astrocitos es la formación de focos de crecimiento en placas de cultivo. Como se puede observar en la **Figura 33**, es evidente la presencia de focos en los astrocitos *Parp-1^{+/+} cRb^{-/-} HRas^{V12}*, mientras que en el caso de los astrocitos *Parp-1^{+/+} cRb^{-/-} HRas^{V12}* el grado de transformación es muy inferior al control. En el caso de los grupos tratados se observa en términos generales un descenso apreciable del número de focos, aunque sin llegar al caso de los astrocitos deficientes en PARP-1.

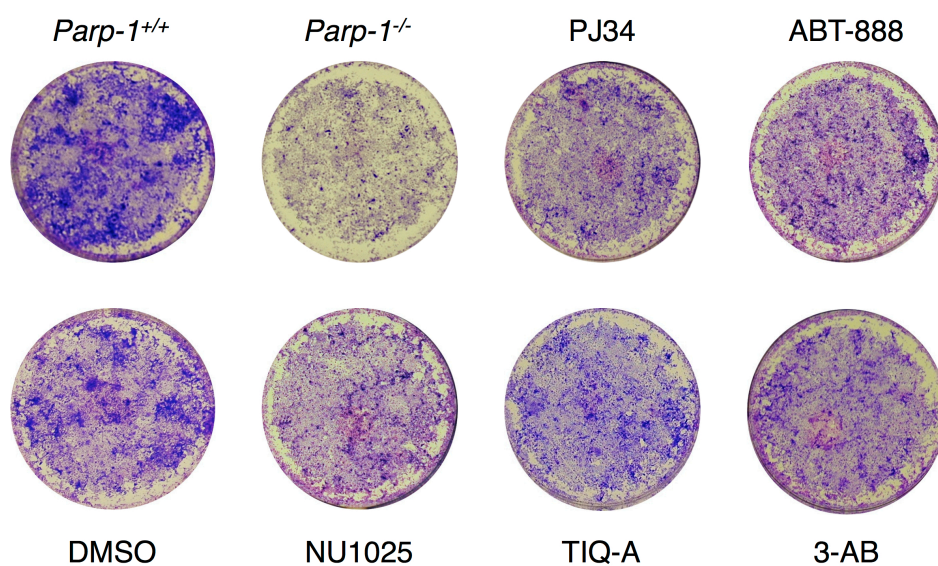


Figura 33.- Formación de colonias en astrocitos *Parp-1^{+/+} cRb^{-/-} HRas^{V12}* y *Parp-1^{-/-} cRb^{-/-} HRas^{V12}*, además de *Parp-1^{+/+} cRb^{-/-} Ras^{V12}* tratados con distintos inhibidores de PARP-1. Se muestran los astrocitos teñidos con cristal violeta 0.1% (p/v) en PBS en el día 7 de cultivo.

En conjunto, podemos resumir estos resultados con la observación de que tanto la delección genética como la inhibición por métodos químicos no sólo afecta a la proliferación de astrocitos transformados en los que E2F-1 se encuentra hiperactivado, sino que también produce cambios morfológicos en los que aumenta el número de células senescentes y se reduce el número de focos de crecimiento en las placas.

En escenarios en los que existe una hiperreplicación del DNA, producida por ejemplo por la activación de un oncogén, se produce una activación de la respuesta al daño en el DNA que desemboca en la aparición de OIS. Este mecanismo de defensa celular consta de varios puntos de control

como por ejemplo p16^{INK4a}, p21^{CIP1} y fundamentalmente p53, que constantemente vigilan el estado de estrés de la célula y en caso de necesitarlo inducen vías de señalización supresoras de tumores, bien deteniendo el ciclo celular o en caso de necesitarlo forzando a la célula a entrar en apoptosis (Bartkova *et al.*, 2005; Collado *et al.*, 2005; Bartkova *et al.*, 2006; Di Micco *et al.*, 2006; Dolado *et al.*, 2007). Teniendo esto en cuenta, quisimos observar si los cambios morfológicos observados anteriormente tendrían un reflejo en las proteínas implicadas en los *checkpoints* de daño en el DNA y para ello realizamos un exhaustivo análisis bioquímico que presentamos a continuación en la **Figura 34**.

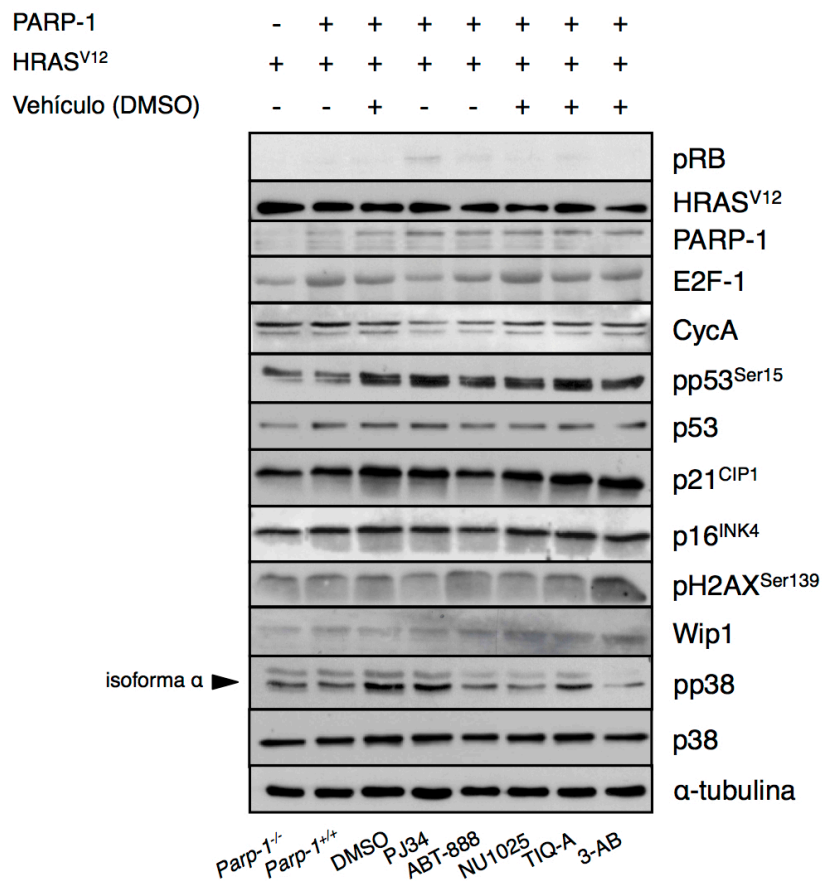


Figura 34.- Análisis bioquímico de los principales puntos de control de la respuesta al daño en el DNA (DDR) además de dianas transcripcionales de E2F-1 como ciclina A y también Wip1, el cual está relacionado con el estado de activación de la MAPK p38 y la transición entre los gliomas de bajo y alto grado.

En cuanto al estado de los puntos de control de la DDR, observamos un aumento significativo de los niveles de proteína de p53 activado (p-p53^{S15}) en

prácticamente todos los grupos tratados con inhibidores de PARP-1. Esto puede ser atribuido en gran medida a la inhibición de la actividad enzimática de PARP que de esta manera potenciaría el daño producido por la hiperreplicación inducida por el oncogén HRas^{V12}. Curiosamente, si nos fijamos en el estado de la fosfo-histona H2AX, este hipotético efecto potenciador del daño en los grupos tratados no parece tener lugar más que en el caso de los astrocitos tratados con ABT-888 y 3-AB, mientras que los niveles de la histona se reducen de manera notable en el caso de PJ34.

Por otra parte, si observamos los niveles del inhibidor de ciclo p21^{CIP1} vemos que éstos también aumentan en casi todos los grupos tratados, lo que explicaría la menor proliferación de estas células con respecto al control sin tratar. En cuanto a la activación transcripcional de E2F-1 observamos dos hechos muy significativos: en primer lugar, tanto los niveles de E2F-1 como de ciclina A aparecen reducidos notablemente tanto en los astrocitos *Parp-1*^{-/-} *cRb*^{-/-} HRas^{V12} como en el grupo tratado con PJ34, los dos grupos con menor proliferación; en segundo lugar, los niveles de p38 fosforilado son mayores en el grupo tratado con PJ34, lo cual hace que nos fijemos en el estado de sus fosfatasa Wip1, que aparece levemente disminuida en los astrocitos deficientes de PARP-1 y en los tratados con vehículo y PJ34.

De manera resumida, podemos ver dos posibles efectos derivados de la inhibición de PARP-1, el primero estaría relacionado con la inhibición química de PARP-1 lo que aumentaría el daño en el DNA al bloquear la actividad enzimática de PARP, implicada en varias vías de reparación del daño en el DNA inducido por el estrés de replicación. Este incremento en el daño al DNA, evidenciado por los elevados niveles de p53 fosforilado, elevaría los niveles de p21 en los grupos tratados con inhibidores aumentando de esta manera el porcentaje de células senescentes en estos grupos. Además, en el caso de las células tratadas con PJ34 éstas experimentan una menor actividad transcripcional de E2F-1, que como recordamos se encuentra hiperactivado debido a la delección de pRb. Esta actividad reducida de E2F-1 se traduce en menores niveles de las proteínas reguladas por este factor de transcripción: el

propio E2F-1, la ciclina A, responsable de la transición G₁/S y también Wip1, fosfatasa de p38MAPK (Hershko *et al.*, 2006). La defosforilación de p38MAPK por parte de Wip1 reduce en gran medida su actividad, haciendo más vulnerables a los astrocitos al proceso de transformación; por contra, la inactivación de Wip1 y por consiguiente, la re-activación de p38MAPK restaura la capacidad de estas células de entrar en senescencia y reducir su tasa proliferativa (Bulavin *et al.*, 2004; Seoane *et al.*, 2008).

3.2. *Rescate de la deficiencia de PARP-1*

De manera complementaria a los experimentos anteriores quisimos comparar los efectos sobre proliferación de la inhibición de PARP-1 por medio del tratamiento con PJ34 con la reinserción de una copia *wild-type* de PARP-1 por transducción retroviral. Para la primera parte del experimento, al igual que antes se modificaron mediante transducción retroviral astrocitos primarios, con la salvedad de que con el objetivo de estudiar de manera individualizada la contribución a la proliferación de la inactivación del supresor de tumores y del oncogén activado incluimos los grupos de astrocitos *Parp-1^{+/+} cRb^{flox/flox}* (PIG/puro), *Parp-1^{+/+} cRb^{flox/flox} HRas^{V12}* (PIG/RAS^{V12}), *Parp-1^{+/+} cRb^{-/-}* (CRE/puro) y *Parp-1^{+/+} cRb^{-/-} HRas^{V12}* (CRE/RAS^{V12}). Los mismos grupos se usaron en el caso del tratamiento con PJ34. Como se puede ver en la **Figura 35** (paneles **a** y **b**) la inhibición con PJ34 reduce de manera significativa la proliferación de los astrocitos transformados *Parp-1^{+/+} cRb^{-/-} HRas^{V12}* y también aunque de manera menos significativa los astrocitos *Parp-1^{+/+} cRb^{flox/flox} HRas^{V12}*. Algo similar ocurre si nos fijamos en el ensayo de la actividad SA-β-galactosidasa, donde el porcentaje de células senescentes aumenta de manera significativa en los grupos tratados, y de manera especial en las células deficientes de pRB (datos no mostrados). En la segunda parte del experimento, incluimos los siguientes grupos experimentales: *Parp-1^{-/-} cRb^{flox/flox}* (PIG/puro), *Parp-1^{-/-} cRb^{flox/flox} HRas^{V12}* (PIG/RAS^{V12}), *Parp-1^{-/-} cRb^{-/-}* (CRE/puro) y *Parp-1^{-/-} cRb^{-/-} HRas^{V12}* (CRE/RAS^{V12}), en el caso de los astrocitos deficientes de PARP-1 y *Parp-1^{-/-} cRb^{flox/flox}* (PIG/puro/PARP), *Parp-1^{-/-} cRb^{flox/flox} HRas^{V12}*

(PIG/RAS^{V12}/PARP), *Parp-1*^{-/-} *cRb*^{-/-} (CRE/puro/PARP) y *Parp-1*^{-/-} *cRb*^{-/-} HRas^{V12} (CRE/RAS^{V12}/PARP) en el caso de los astrocitos rescatados con PARP-1.

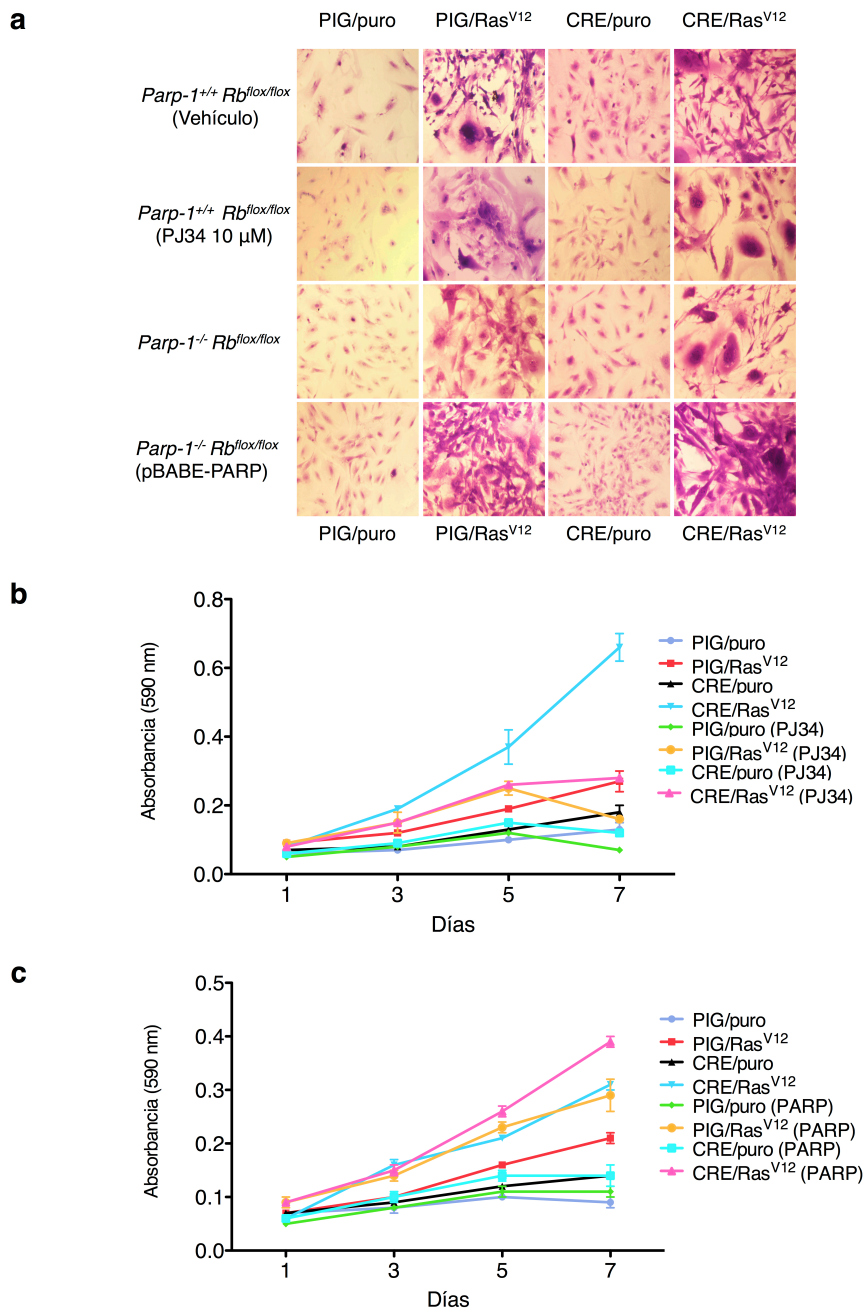


Figura 35.- a, morfología de los astrocitos *Parp-1*^{+/+} control, tratados con el inhibidor PJ34, astrocitos *Parp-1*^{-/-} control y *Parp-1*^{-/-} que reexpresan PARP-1; **b**, curva de proliferación de los astrocitos *Parp-1*^{+/+} *cRb*^{flx/flx} control y tratados con PJ34; **c**, curva de proliferación de los astrocitos *Parp-1*^{-/-} *cRb*^{flx/flx} control y co-infectados con una copia funcional de PARP-1.

Como se puede observar en la **Figura 35** (paneles **a** y **c**) el rescate del fenotipo, la re-expresión de un alelo *wild-type* de PARP-1 tiene un pequeño aunque apreciable efecto sobre la proliferación tanto en los grupos

experimentales que expresan Ras oncogénico como en los deficientes de pRb. Cabe destacar también la morfología de los astrocitos *knock-out* con PARP-1 reexpresado ya que demuestran un grado de transformación más acusado y por ello más similar a los astrocitos *Parp-1^{+/+}* que a los *Parp-1^{-/-}* control. Por el contrario, en cuanto a la senescencia y apoptosis, PARP-1 no parece tener un efecto significativo sobre los astrocitos (datos no mostrados).

3.3. Ensayos de transformación *in vivo*

Como colofón a estos experimentos de oncogénesis, quisimos comprobar si finalmente la ausencia del gen o la inhibición transitoria de PARP-1 podría repercutir sobre la transformación de astrocitos modificados *in vivo*. Para ello inyectamos subcutáneamente en el flanco de los cuartos traseros de ratones SCID inmunodeficientes astrocitos *Parp-1^{-/-} cRb^{-/-} HRas^{V12}* o *Parp-1^{+/+} cRb^{-/-} HRas^{V12}* dividiéndolos en varios grupos experimentales. Los resultados se muestran a continuación en la **Figura 36**.

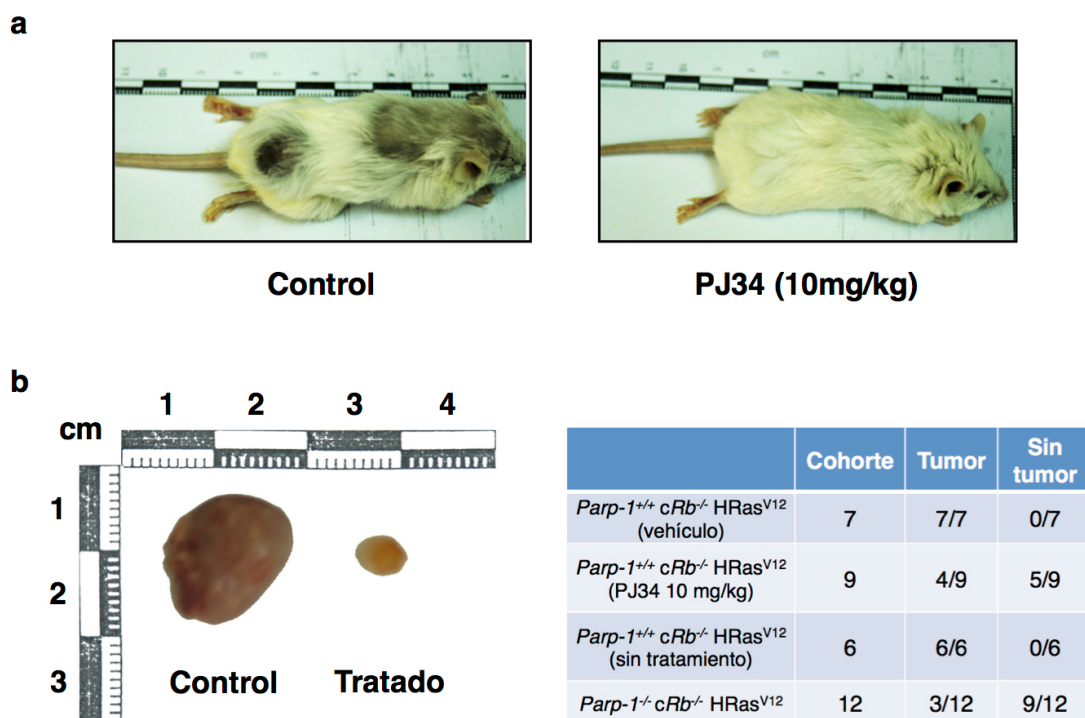


Figura 36.- a, Fotografías de ratones SCID inyectados subcutáneamente con $3 \cdot 10^6$ astrocitos *Parp-1^{+/+} cRb^{-/-} HRas^{V12}* tratados con vehículo (derecha) o PJ34 (10 mg/kg); **b**, Comparación *ex vivo* de las masas tumorales y tabla con las cohortes de cada grupo: *Parp-1^{+/+} cRb^{-/-} HRas^{V12}* (sin tratar, vehículo, PJ34) y *Parp-1^{-/-} cRb^{-/-} HRas^{V12}*.

Tal y como se puede observar en la figura, un único tratamiento intraperitoneal de PJ34 (10 mg/kg) tiene un efecto muy notable tanto sobre el volumen final de las masas tumorales obtenidas (**Figura 37a**) así como sobre la supervivencia libre de tumor, superando en el caso de los ratones tratados el 50% del total de individuos (55%). Si atendemos a la curva de supervivencia de estos ratones frente a su control observamos que el tratamiento comienza a ser efectivo produciendo una reducción del volumen del tumor cuatro semanas después de la inyección de PJ34, con el proceso culminando a las nueve semanas en las que el tumor se ha reabsorbido por completo (**Figura 37b**).

De igual manera, en el caso de los astrocitos deficientes de PARP-1, el número de casos libres de tumor se elevó hasta el 75%, donde sólo 3 ratones de los 12 inyectados llegaron a desarrollar tumor. En cuanto a los controles, observamos que tanto en los individuos tratados con el vehículo (PBS) como los no tratados, el 100% de los ratones desarrolló tumores tal y como se describe en los resultados obtenidos anteriormente por nuestro grupo (Seoane *et al.*, 2008).

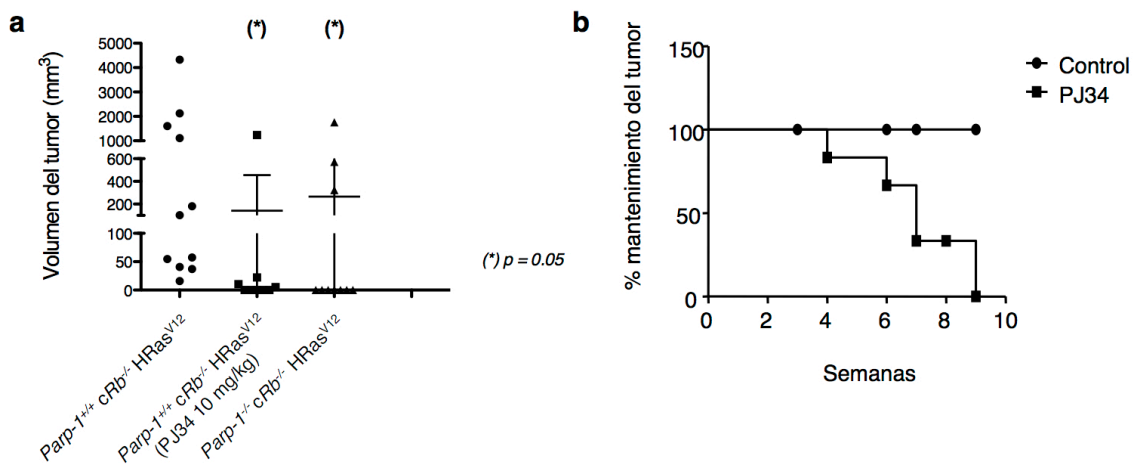


Figura 37.- a, comparación de los volúmenes tumorales de cada grupo experimental (*Parp-1^{-/-} cRb^{-/-} HRas^{V12}*, *Parp-1^{+/+} cRb^{-/-} HRas^{V12}* control y *Parp-1^{+/+} cRb^{-/-} HRas^{V12}* tratado con PJ34). La diferencia es significativa en el caso de los grupos *Parp-1^{-/-} cRb^{-/-} HRas^{V12}* y *Parp-1^{+/+} cRb^{-/-} HRas^{V12}* tratado con PJ34 (ANOVA de una vía); **b**, Curvas de supervivencia de mantenimiento de tumor a partir del tratamiento, comparando los ratones inyectados con astrocitos *Parp-1^{+/+} cRb^{-/-} HRas^{V12}* control y tratados con PJ34.

El análisis histológico de las muestras (**Figura 38**) de estos tumores revela un marcaje moderadamente positivo del marcador de proliferación histona H3 fosforilada en los tumores *Parp-1^{+/+} cRb^{-/-} HRas^{V12}* tratados mientras que los astrocitos *Parp-1^{+/+} cRb^{-/-} HRas^{V12}* control demuestran un elevado marcaje, lo cual se corresponde con su penetrancia del 100% en los trece casos estudiados (siete tratados con vehículo y seis sin tratar).

Por último, los tumores *Parp-1^{-/-} cRb^{-/-} HRas^{V12}* también muestran una señal muy débil de histona H3 fosforilada pero que a diferencia de los tumores tratados con PJ34 presentan un marcaje muy positivo de caspasa 3 activada. Este alto índice de apoptosis podría explicar que sólo en el 25% de los casos estudiados se hayan desarrollado masas tumorales estables durante el mismo tiempo que los controles *Parp-1^{+/+}*, produciéndose en varios casos una reabsorción de la masa tumoral a las pocas semanas de su aparición.

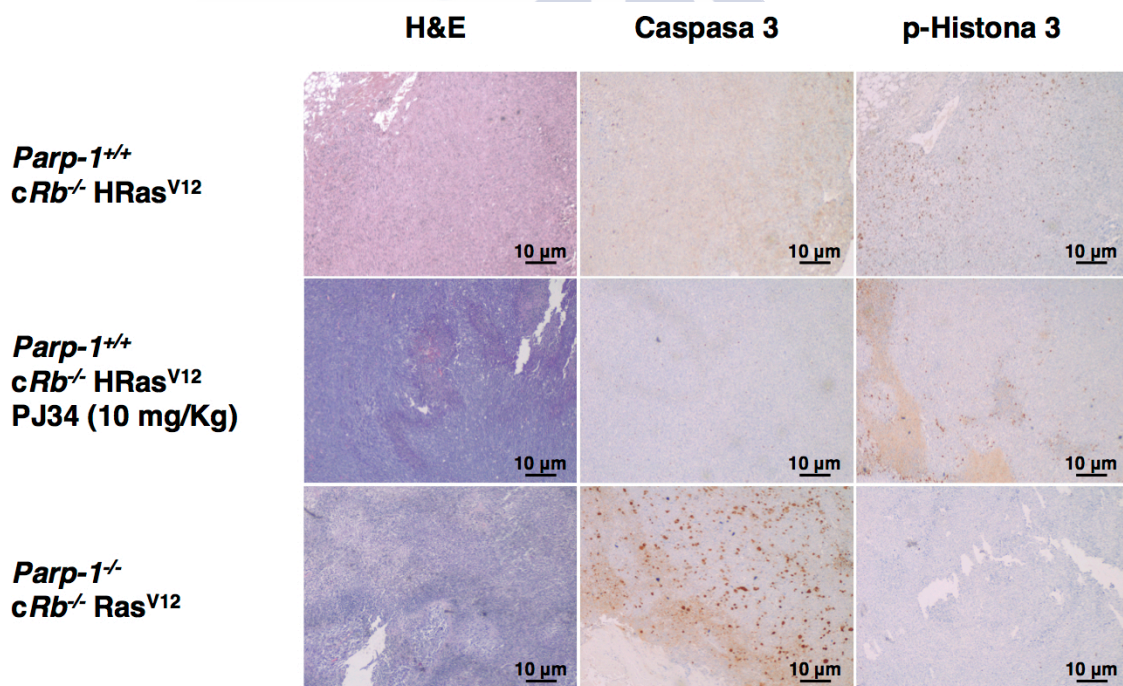


Figura 38.- Análisis histológico de los tumores obtenidos en los grupos experimentales *Parp-1^{-/-} cRb^{-/-} HRas^{V12}*, *Parp-1^{+/+} cRb^{-/-} HRas^{V12}* control y *Parp-1^{+/+} cRb^{-/-} HRas^{V12}* tratado con PJ34. Se observa un marcaje positivo del marcador de proliferación histona H3 fosforilada en el grupo control con respecto el grupo tratado y las células experimentales *Parp-1^{-/-} cRb^{-/-} HRas^{V12}*.



DISCUSIÓN



Discusión

La inactividad funcional del supresor de tumores pRB presente en diversos tipos de tumores y modelos de animales transgénicos conlleva una desregulación de la actividad transcripcional de E2F-1, la cual se correlaciona con una proliferación aberrante de la célula y en algunos casos con la muerte celular (DeGregori *et al.*, 2006; laquinta *et al.*, 2007; Dimova *et al.*, 2005). Los efectos de la deficiencia de retinoblastoma, o hiperactivación de E2F-1, han sido estudiados con profundidad tanto en relación al inicio del proceso oncogénico (Malumbres *et al.*, 2001; Bosco *et al.*, 2007; Knudsen *et al.*, 2008), como al desarrollo embrionario, que en ratones produce letalidad embrionaria (Jacks *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 2003).

Tomando como punto de partida los estudios realizados por Simbulan-Rosenthal (Simbulan-Rosenthal *et al.*, 1999; Simbulan-Rosenthal *et al.*, 2003) y resultados previos de nuestro grupo de investigación, hemos demostrado que la proteína PARP-1 desempeña un papel importante en la actividad transcripcional de E2F-1 al ser capaz de modificarla en la interfase entre G₁ y la fase S temprana. Esta modulación de E2F-1 se produce por medio de la interacción directa de ambas proteínas y que en el caso de PARP-1 tiene lugar por medio del dominio central o de automodificación el cual contiene un motivo BRCT similar al de otras proteínas que interaccionan con E2F-1. En los estudios publicados por Simbulan-Rosenthal y colaboradores se demuestra también mediante ensayos *in vitro* que la unión de PARP-1 y E2F-1 ocurre directamente sobre el promotor de E2F-1, un hecho que nosotros hemos corroborado y complementado observando dicha interacción en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) sobre el propio promotor de E2F-1 así como en el de la ciclina A, una diana transcripcional de E2F-1. De manera similar, observamos también que la hiperactivación de la actividad transcripcional de E2F-1 en células deficientes de pRb puede ser reducida si PARP-1 también se encuentra ausente, lo cual confirma el papel como co-activador de E2F-1 de esta proteína.

Aunque esta interacción no parece ser dependiente de la actividad enzimática de PARP-1 ya que E2F-1 no resulta poli(ADP-ribosil)ada en ensayos *in vitro* si observamos que el tratamiento con un inhibidor en MEFs sincronizados por serodeprivación es capaz de reducir los niveles de RNA mensajero (mRNA) de algunas dianas transcripcionales de E2F-1 como la polimerasa POLA1 o la fosfatasa WIP-1, la cual está implicada en la transición entre gliomas de bajo y alto grado (Bulavin *et al.*, 2004; Seoane *et al.*, 2008). Curiosamente, al analizar la transactivación debida a E2F-1 en un ensayo luciferasa en células tratadas con varios inhibidores de la actividad enzimática de PARP-1 observamos en el caso del inhibidor PJ34 un efecto similar al grupo tratado con gosispol, una molécula capaz de bloquear específicamente las interacciones proteína-proteína mediadas por el motivo BRCT de PARP-1 como en el caso de E2F-1 (Na *et al.*, 2015). Esta tendencia se ve replicada al estudiar la proliferación de MEFs tratados con estos mismos inhibidores lo cual nos hace pensar que quizás al igual que gosispol, PJ34 tenga un mecanismo de acción similar sobre la interacción entre PARP-1 y E2F-1.

Gosispol es un compuesto de origen natural obtenido habitualmente como una mezcla racémica de dos atropisómeros de los cuales sólo el isómero (-)-gosispol posee la capacidad de interferir con las interacciones proteína-proteína de PARP-1. Mecánicamente, esta actividad biológica se traduce en la capacidad de esta molécula de reaccionar formando una base de Schiff al reaccionar sus dos grupos funcionales aldehído con los grupos amino de las lisinas 438 y 441 del dominio BRCT, bloqueando así cualquier posible interacción entre PARP-1 y otras proteínas. En el caso de PJ34, esta molécula carece de grupos aldehídos que permitan una interacción similar a la de gosispol con el dominio BRCT de PARP-1. Como es sabido, este inhibidor desarrollado por Inotek (Abdelkarim *et al.*, 2001) como otros muchos inhibidores de PARP-1 toma como modelo estructural la nicotinamida (NAM) para unirse a su sitio de unión en el centro catalítico de la enzima y bloquear así su actividad. Además de unirse al NAM *pocket*, esta molécula es capaz de localizarse entre la hélice α y el *D-loop* de la tanquirasa-1 (PARP-5a), ambos motivos estructurales que también se encuentran presentes en los dominios

catalíticos de PARP-1, lo cual sugiere que al igual que PARP-5a es capaz de unir dos moléculas de PJ34 simultáneamente en ambos lugares de unión (Ekblad *et al.*, 2013).

En relación a estos resultados, los ensayos con las proteínas de fusión EGFP-PARP-1 y RFP-E2F-1 no sólo corroboran que la co-localización de PARP-1 y E2F-1 aumenta a medida que transcurre el tiempo avanzando de la fase G₁ a la S, sino que en el caso de las células tratadas con PJ34 los niveles de la proteína de fusión RFP-E2F-1 parecen disminuir de manera apreciable. Como se pudo comprobar a continuación, en estas mismas células sincronizadas, cuya traducción proteica se había inhibido por medio del tratamiento con cicloheximida, los niveles de E2F-1 disminuyen de manera más pronunciada a medida que transcurre el tiempo en el caso de PJ34, lo cual nos sugiere que este inhibidor puede tener un efecto sobre la estabilidad del factor de transcripción E2F-1.

Por otra parte, es destacable el hecho que la interacción entre PARP-1 y E2F-1 parece afectar a la interacción entre E2F-1 y TopBP1. Esta unión se encuentra condicionada por la fosforilación del residuo Ser³¹ de E2F-1 por medio de ATM tras detectarse la presencia de daño en el DNA y su principal efecto es la represión transcripcional de E2F-1 en la interfase G₁/S (Liu *et al.*, 2003; Loeffler *et al.*, 2011). Nuestros datos además de demostrar que la ausencia de PARP-1 produce un efecto sobre la actividad transcripcional de E2F-1 netamente superior a la represión debida a la interacción con TopBP1, también revelan que la co-inmunoprecipitación de PARP-1 se incrementa en el caso del mutante E2F-1^{S31A}, el cual anula la interacción con TopBP1, con respecto al mutante E2F-1^{S31D} que la promueve de manera constitutiva. Curiosamente, TopBP1 se localiza en focos donde se ha producido daño en el DNA por irradiación, formando parte de macrocomplejos de reparación a los que atrae a E2F-1, potenciando el reclutamiento de otros factores implicados en la reparación por medio de BER (*base excision repair*) (Mäkiniemi *et al.*, 2001; Yamane *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2010). La actividad reparadora del DNA de PARP-1 conlleva la interacción y reclutamiento de otras proteínas como es

el caso de XRCC1, implicadas en el mecanismo de escisión de nucleótidos. Esta circunstancia hace pensar en un hipotético mecanismo concertado en el que en ausencia de daño PARP-1 y E2F-1 son libres de interactuar haciendo que el ciclo celular progrese de manera normal hasta la fase S, ambas proteínas unidas transactivando diversos genes específicos, y la mitosis en el que PARP-1 desempeña otras funciones relacionadas con el mantenimiento de la integridad cromosómica y el funcionamiento del huso mitótico (Iglesias y Costoya, 2014). En el caso en el que ocurra daño en el DNA, debido por ejemplo a radiación ionizante, éste es detectado y en la respuesta inducida la quinasa ATM fosforila al factor de transcripción E2F-1 que pasa a interactuar con el represor TopBP1. Esta unión detiene el avance del ciclo celular a la entrada de la fase S y por tanto de la replicación del DNA, interrumpiendo las horquillas de replicación en las que se encuentra TopBP1 y a las que atrae a E2F-1 donde ejerce su actividad como reclutador de otros factores implicados en la reparación, proceso al que PARP-1 también contribuye uniéndose a las secuencias del DNA dañadas.

Por otra parte, los efectos de la deficiencia de PARP-1 durante las etapas del desarrollo embrionario confirman en gran medida su papel como co-activador de E2F-1. En cuanto a la letalidad embrionaria del genotipo $Rb^{-/-}$, los embriones $Parp-1^{-/-} Rb^{-/-}$ experimentan un retraso hasta los estadios E15,5-E16,5, manteniéndose la morfología del embrión incluso en individuos no viables en etapas posteriores. Además, se observa una notable reducción de la apoptosis en tejidos hepáticos embrionarios y placentarios, que se asocian de manera inequívoca a la deficiencia de retinoblastoma durante el desarrollo (Jacks *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 2003), así como un aumento significativo del número de RCBs en comparación a los embriones $Rb^{-/-}$ en el estadio E13,5. En cuanto a la incidencia de tumores asociados a la pérdida estocástica del alelo de retinoblastoma restante en individuos heterocigotos, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a los volúmenes de los adenomas hipofisarios analizados o las características histopatológicas de estos adenomas, pero sí se observó un descenso del número de individuos no afectados en el caso del genotipo $Parp-1^{-/-} Rb^{+/-}$.

Estos datos tomados en conjunto nos indican de manera clara que los embriones *Parp-1^{-/-} Rb^{-/-}* son completamente viables en los estadios asociados en los que se ha descrito la letalidad embrionaria del *knockout* de pRb y recapitulan al menos de manera parcial el fenotipo de los ratones *E2f-1^{-/-} Rb^{-/-}*, el cual también consigue extender el período de viabilidad embrionaria y suavizar la incidencia de tumores pituitarios y tiroideos en individuos heterocigotos (Tsai *et al.*, 1998; Yamasaki *et al.*, 1998). Todo ello nos hace pensar que la deficiencia de PARP-1 *in vivo* tiene un efecto importante sobre la actividad de E2F-1, y que de manera similar a lo observado en cultivos celulares la inactivación de PARP-1 tiene como consecuencia una hipoactivación de E2F-1 y rescata parcialmente los efectos deletéreos de su hiperactivación derivados de la pérdida de retinoblastoma.

Por último, quisimos comprobar si esta cooperación entre ambas proteínas se extendía también a un contexto oncogénico, lo cual nos permitiría modular la actividad de E2F-1 por medio de la inhibición de PARP-1. Para ello hemos utilizado un modelo de gliomagénesis ya caracterizado por nuestro grupo de investigación y que se basa en gran medida en la hiperactivación de E2F-1 al delecionar de manera condicional pRb (Seoane *et al.*, 2008). Al igual que con células no transformadas, la inhibición de PARP-1 resulta en una menor proliferación además de disminuir, de manera notable en el caso de PJ34, la agresividad y la transformación celular observada en las células control (*Parp-1^{+/+} cRb^{-/-} HRas^{V12}*). Sin embargo, también observamos que en el caso de las células tratadas con PJ34 se incrementa el porcentaje de células senescentes en el cultivo, lo que explicaría también la menor tasa proliferativa de los astrocitos tratados con este inhibidor, además de generar menor número de focos o colonias en comparación con los astrocitos control no tratados. De igual manera, aunque el análisis bioquímico revela un incremento de los niveles del inhibidor de ciclo p21^{CIP} así como de p53 fosforilado en el caso del grupo tratado con PJ34 y explicaría el aumento de células senescentes observado anteriormente, llama la atención la ausencia de senescencia en las células carentes de PARP-1, *Parp-1^{-/-} cRb^{-/-} HRas^{V12}*.

Con respecto a este resultado, es importante tener en consideración que PJ34, al igual que el resto de los inhibidores utilizados, pueda presentar algún efecto *off-target* o inespecífico que pueda confundir los resultados obtenidos. Una revisión de la literatura disponible nos revela que PJ34 además de presentar una alta afinidad por los centros catalíticos de PARP-1 y PARP-2, esperable ya que son los que mayor homología poseen entre sí, también es capaz de unirse al de varios miembros de su familia (PARP-3, -4, -5a, -5b, -14, -16) (Wahlberg *et al.*, 2012), así como la metaloproteasa MMP-2 y las quinasas PIM1 y PIM2 aunque con menor avidéz (Antolín *et al.*, 2012). A pesar de la aparente redundancia de las funciones biológicas de las distintas PARP, especialmente PARP-1 y PARP-2, son cada vez más las funciones específicas que se descubren para estas proteínas (Yélamos *et al.*, 2008; Hsiao *et al.*, 2008; Iglesias *et al.*, 2014). Así, es lógico sospechar que la inhibición conjunta de varios miembros de esta familia pueda tener efectos más duraderos y/o profundos que la delección de PARP-1 solamente y que por ello expliquen estas diferencias entre las *Parp-1^{-/-} cRb^{-/-} HRas^{V12}* y las *Parp-1^{+/+} cRb^{-/-} HRas^{V12}* tratadas con PJ34.

También es destacable, aunque esperado, el descenso de los niveles de E2F-1 y ciclina A en este grupo y en el de las células *Parp-1^{-/-} cRb^{-/-} HRas^{V12}* ya que ambas proteínas son dianas transcripcionales del propio E2F-1. Curiosamente, los niveles de la quinasa p38- α (MAPK14) aumentan también en el caso del tratamiento con PJ34 a diferencia de las células control. Como ya hemos observado en estudios previos de nuestro laboratorio, los niveles de senescencia inducida por oncogénesis (OIS) en astrocitos *cRb^{-/-} HRas^{V12}* se encuentran íntimamente relacionados con la actividad de la fosfatasa específica de p38- α , Wip1. Esta fosfatasa, una vez inactivada permite a p38 activarse y ejercer como freno de la tumorigénesis al forzar a los astrocitos a ralentizar su proliferación entrando en un estado senescente (Bulavin *et al.*, 2004; Seoane *et al.*, 2008). De la misma manera, al reducir la actividad transcripcional de E2F-1, reducimos también los niveles de Wip1 y por consiguiente la proliferación de estas células que desprovistas de la

protección de esta fosfatasa se ven afectadas por la senescencia mediada por oncogenes, y que en nuestro caso es HRas^{V12}.

Como complemento de estos resultados, quisimos verificar una vez más que la ausencia de PARP-1 es responsable del cambio de fenotipo y agresividad en nuestros astrocitos. En los resultados que hemos presentado anteriormente se puede observar con claridad que la re inserción de una copia funcional de PARP-1 aumenta la proliferación y el grado de transformación de los astrocitos *Parp-1^{-/-} cRb^{-/-} HRas^{V12}*, mientras que al igual que en el anterior experimento, la inhibición química de PARP-1 por medio de PJ34 produce un efecto antagónico. A esta misma conclusión llegamos al inyectar esos astrocitos en ratones SCID, ya que las células *Parp-1^{-/-} cRb^{-/-} HRas^{V12}* presentaron una capacidad de formar tumores muy reducida en comparación con los grupos control. A su vez, un tratamiento monodosis (10 mg/kg) con el inhibidor PJ34 fue suficiente para reducir el número de casos de individuos afectados en el control (100%) a casi la mitad (55%) así como de los volúmenes de las masas obtenidas en los ratones tratados. Por último, el análisis inmunohistológico de estos tejidos tumorales confirmó que en el caso del tratamiento con PJ34, la proliferación se ve ampliamente reducida como se puede observar en el escaso marcaje de la histona H3 fosforilada en comparación al tejido control. En el caso de los tumores de astrocitos *Parp-1^{-/-} cRb^{-/-} HRas^{V12}*, el marcaje de células en proliferación también se vio reducido pero a diferencia de lo ocurrido en los estudios de oncogénesis *in vitro*, los niveles de apoptosis celular se disparan en el interior del tumor.

En resumen, en el presente estudio hemos querido investigar las implicaciones biológicas de la interacción PARP-1/E2F-1 en escenarios en los que el factor de transcripción E2F-1 resulta de gran importancia como son el desarrollo embrionario y la oncogénesis. A este respecto, hemos demostrado que el tratamiento por medio del inhibidor enzimático PJ34 o del inhibidor de interacciones proteína-proteína gossipol es capaz de reducir la actividad transcripcional de E2F-1 y la proliferación de las células tratadas. El papel de PARP-1 como co-activador de E2F-1 no se limita a su papel en la regulación

del ciclo celular sino que también se confirma como importante durante el desarrollo embrionario como se deduce al observar en los embriones *Parp-1^{-/-} Rb^{-/-}* un fenotipo similar al de los ratones *E2f-1^{-/-} Rb^{-/-}*. Además, la delección o inhibición de PARP-1 protege a la célula frente a estímulos oncogénicos al reducir su tasa proliferativa, tanto *in vivo* como *in vitro*, o bien reactivar otras rutas de señalización celular implicadas en la senescencia inducida por oncogénesis.





CONCLUSIONES



Conclusiones

- La interacción entre PARP-1 y E2F-1 tiene un efecto importante sobre la actividad transcripcional de E2F-1 y por tanto sobre la proliferación celular.
- Esta interacción parece complementarse con la que ocurre entre E2F-1 y la topoisomerasa TopBP1, la cual actúa como represora de la actividad transcripcional de E2F-1.
- Los efectos de la interacción entre PARP-1 y E2F-1 no sólo afectan a la proliferación celular sino que se observan también en procesos complejos como la embriogénesis o la oncogénesis, en los que PARP-1 actúa como co-activador de E2F-1.
- La inactivación de PARP-1 durante las etapas de desarrollo rescata de manera parcial la letalidad embrionaria debida a la deficiencia de expresión de la proteína retinoblastoma.
- El inhibidor de PARP-1 PJ34 parece afectar a la estabilidad de la proteína E2F-1, reduciendo la proliferación celular y restableciendo la senescencia inducida por oncogenes en un modelo animal de glioma.





BIBLIOGRAFÍA



Bibliografía

Abdelkarim GE, Gertz K, Harms C, Katchanov J, Dirnagl U, Szabó C, Endres M. (2001) Protective effects of PJ34, a novel, potent inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in in vitro y in vivo models of stroke. *Int J Mol Med.*7(3):255-60.

Aguilar-Quesada R, Muñoz-Gámez JA, Martín-Oliva D, Peralta A, Valenzuela MT, Matínez-Romero R, Quiles-Pérez R, Menissier-de Murcia J, de Murcia G, Ruiz de Almodóvar M, Oliver FJ. (2007). Interaction between ATM y PARP-1 in response to DNA damage y sensitization of ATM deficient cells through PARP inhibition. *BMC Mol. Biol.* 8, 29.

Ahmadian MR, Stege P, Scheffzek K, Wittinghofer A. (1997) Confirmation of the arginine-finger hypothesis for the GAP-stimulated GTP-hydrolysis reaction of Ras. *Nat Struct Biol.* 4(9):686-9.

Akiyama T, Takasawa S, Nata K, Kobayashi S, Abe M, Shervani NJ, Ikeda T, Nakagawa K, Unno M, Matsuno S *et al.*, (2001) Activation of Reg gene, a gene for insulin-producing beta-cell regeneration: poly(ADP-ribose) polymerase binds Reg promoter y regulates the transcription by autopoly(ADP-ribosyl)ation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 48-53.

Althaus FR. (2005) Poly(ADP-ribose): a co-regulator of DNA methylation? *Oncogene* 24: 11-12.

Alvarez-Gonzalez R, Watkins TA, Gill PK, Reed JL, Mendoza-Alvarez H. (1999). Regulatory mechanisms of poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol. Cell. Biochem.* 193: 19-22.

Ambrose HE, Papadopoulou V, Beswick RW, Wagner SD. (2007) Poly-(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1) binds in a sequence- specific manner at the Bcl-6 locus y contributes to the regulation of Bcl-6 transcription. *Oncogene* 26: 6244-6252.

Amé JC, Spenlehauer C, de Murcia G. (2004) The PARP superfamily. *BioEssays* 26:882-893.

Amiri KI, Ha HC, Smulson ME, Richmond A. (2006) Differential regulation of CXCL1 ligand 1 transcription in melanoma cell lines by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Oncogene* 25: 7714-7722.

Antolín AA, Jalencas X, Yélamos J, Mestres J. (2012) Identification of pim kinases as novel targets for PJ34 with confounding effects in PARP biology. *ACS Chem Biol.* 7(12):1962-7.

Armitage P, Doll R. (1954) The age distribution of cancer y a multi-stage theory of carcinogenesis. *Br J Cancer.* 8(1):1-12.

Audebert M, Salles B, Calsou P. (2004) Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 y XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J Biol Chem.* 279(53):55117-26.

- Banasik M, Komura H, Shimoyama M, Ueda K. (1992) Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase y mono(ADP-ribosyl)transferase. *J Biol Chem.* 267(3): 1569-75.
- Bandara LR, Buck VM, Zamanian M, Johnston LH, La Thangue NB. (1993) Functional synergy between DP-1 y E2F-1 in the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F. *EMBO J.* 12(11): 4317-24.
- Barbacid M. (1987) ras genes. *Annu Rev Biochem.* 56:779-827.
- Bartkova J, Horejsí Z, Koed K, Krämer A, Tort F, Zieger K, Guldborg P, Sehested M, Nesland JM, Lukas C, Ørntoft T, Lukas J, Bartek J. (2005) DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature.* 434(7035):864-70.
- Bartkova J, Rezaei N, Lontos M, Karakaidos P, Kletsas D, Issaeva N, Vassiliou LV, Kolettas E, Niforou K, Zoumpourlis VC, Takaoka M, Nakagawa H, Tort F, Fugger K, Johansson F, Sehested M, yersen CL, Dyrskjot L, Ørntoft T, Lukas J, Kittas C, Helleday T, Halazonetis TD, Bartek J, Gorgoulis VG. (2006) Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature.* 2006 Nov 30;444(7119):633-7.
- Bell AC, Felsenfeld G. (2000) Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature* 405: 482-485.
- Benjamin RC, Gill DM. (1980) ADP-ribosylation in mammalian cell ghosts. Dependence of poly (ADP-ribose) synthesis on strand breakage in DNA. *J Biol Chem.* 255:10493-10501.
- Bhattacharyya A, Ear US, Koller BH, Weichselbaum RR, Bishop DK. (2000) The breast cancer susceptibility gene BRCA1 is required for subnuclear assembly of Rad51 y survival following treatment with the DNA cross-linking agent cisplatin. *J Biol Chem.* 275(31): 23899-903.
- Bosco EE, Knudsen ES. (2007) RB in breast cancer: at the crossroads of tumorigenesis y treatment. *Cell Cycle* 6(6): 667-71.
- Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. (1983) A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature.* 301(5900):527-30.
- Bouchard VJ, Rouleau M, Poirier GG. (2003) PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Exp Hematol* 31(6): 446-54.
- Bourne HR, Wrischnik L, Kenyon C. (1990) Ras proteins. Some signal developments. *Nature.* 348(6303):678-9.
- Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. (1995) A versatile vector for gene y oligonucleotide transfer into cells in culture y in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(16):7297-301.
- Bracken AP, Ciro M, Cocito A, Helin K. (2004) E2F target genes: unraveling the biology. *Trends Biochem Sci.* 29(8):409-17.

Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T. (1998) Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature*. 391(6667):597-601.

Bryant HE, Petermann E, Schultz N, Jemth AS, Loseva O, Issaeva N, Johansson F, Fernandez S, McGlynn P, Helleday T. (2009) PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination. *EMBO J* 28(17):2601-15.

Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, Kyle S, Meuth M, Curtin NJ, Helleday T. (2005) Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*. 434(7035): 913-7.

Buhrman G, Holzapfel G, Fetis S, Mattos C. (2010) Allosteric modulation of Ras positions Q61 for a direct role in catalysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(11):4931-6.

Bulavin DV, Phillips C, Nannenga B, Timofeev O, Donehower LA, Yerson CW, Appella E, Fornace AJ Jr. (2004) Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway. *Nat Genet*. 36(4):343-50.

Butler AJ, Ordahl CP (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase binds with transcription enhancer factor 1 to MCAT1 elements to regulate muscle-specific transcription. *Mol Cell Biol* 19: 296-306.

Canan Koch SS, Thoresen LH, Tikhe JG, Maegley KA, Almassy RJ, Li J, Yu XH, Zook SE, Kumpf RA, Zhang C, Boritzki TJ, Mansour RN, Zhang KE, Ekker A, Calabrese CR, Curtin NJ, Kyle S, Thomas HD, Wang LZ, Calvert AH, Golding BT, Griffin RJ, Newell DR, Webber SE, Hostomsky Z. (2002) Novel Tricyclic Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 Inhibitors with Potent Anticancer Chemopotentiating Activity: Design, Synthesis, and X-ray Cocrystal Structure. *J Med Chem*. 45(23): 4961-74.

Carnevale J, Palander O, Seifried LA, Dick FA. (2012) DNA damage signals through differentially modified E2F1 molecules to induce apoptosis. *Mol Cell Biol*. 32(5):900-12.

Carroll PE, Okuda M, Horn HF, Biddinger P, Stambrook PJ, Gleich LL, Li YQ, Tarapore P, Fukasawa K. (1999) Centrosome hyperamplification in human cancer: chromosome instability induced by p53 mutation and/or Mdm2 overexpression. *Oncogene* 18(11): 1935-44.

Cartwright P, Müller H, Wagener C, Holm K, Helin K. (1998) E2F-6: a novel member of the E2F family is an inhibitor of E2F-dependent transcription. *Oncogene*. 17(5):611-23.

Chambon P, Weill JD, Doly J, Strosser MT, Mandel P. (1966) On the formation of a novel adenylic compound by enzymatic extracts of liver nuclei. *Biochem Biophys Res Commun*. 25(6): 638-643.

Chambon P, Weill JD, Mandel P. (1963) Nicotinamide mononucleotide activation of a new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem Biophys Res Commun*, 11: 39-43.

Chang P, Jacobson MK, Mitchison TJ. (2004) Poly(ADP-ribose) is required for spindle assembly y structure. *Nature* 432(7017): 645-9.

Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR. (1991) The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* 65(6): 1053-61.

Chen D, Pacal M, Wenzel P, Knoepfler PS, Leone G, Bremner R. (2009) Division y apoptosis of E2f-deficient retinal progenitors. *Nature*. 462(7275):925-9.

Chen HZ, Tsai SY, Leone G. (2009) Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat Rev Cancer* 9(11):785-97.

Cherney BW, McBride OW, Chen DF, Alkhatib H, Bhatia K, Hensley P, Smulson ME. (1987) cDNA sequence, protein structure, y chromosomal location of the human gene for poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84(23):8370-4.

Chittenden T, Livingston DM, DeCaprio JA. (1993) Cell cycle analysis of E2F in primary human T cells reveals novel E2F complexes y biochemically distinct forms of free E2F. *Mol Cell Biol*. 13(7):3975-83.

Chong JL, Tsai SY, Sharma N, Opavsky R, Price R, Wu L, Fernandez SA, Leone G. (2009) E2f3a y E2f3b contribute to the control of cell proliferation y mouse development. *Mol Cel Biol*. 29(2):414-24.

Chong JL, Wenzel PL, Sáenz-Robles MT, Nair V, Ferrey A, Hagan JP, Gomez YM, Sharma N, Chen HZ, Ouseph M, Wang SH, Trikha P, Culp B, Mezache L, Winton DJ, Sansom OJ, Chen D, Bremner R, Cantalupo PG, Robinson ML, Pipas JM, Leone G. (2009) E2f1-3 switch from activators in progenitor cells to repressors in differentiating cells. *Nature*. 462(7275):930-4.

Chonghaile T, Letai A (2009) Mimicking the BH3 domain to kill cancer cells. *Oncogene*. Suppl 1:S149-57.

Christensen J, Cloos P, Toftegaard U, Klinkenberg D, Bracken AP, Trinh E, Heeran M, Di Stefano L, Helin K. (2005). Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell-cycle regulated repressor of E2F-activated transcription. *Nucleic Acids Res*. 33(17):5458-70.

Clarke A, Maandag E, van Roon M, van der Lugt N, van der Valk M, Hooper M, Berns A, te Riele H. (1992). Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature* 359, 328-330.

Cobb MH, Sang BC, Gonzalez R, Goldsmith E, Ellis L. (1989). Auto- phosphorylation activates the soluble cytoplasmic domain of the insulin receptor in an intermolecular reaction. *J. Biol. Chem*. 264:18701-18706.

Cohen-Armon M, Visochek L, Rozensal D, Kalal A, Geistrikh I, Klein R, Bendetz-Nezer S, Yao Z, Seger R. (2007) DNA-independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation. *Mol Cell* 25: 297-308.

Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, Benguría A, Zaballos A, Flores JM, Barbacid M, Beach D, Serrano M. (2005) Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*. 436(7051):642.

D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG. (1999) Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J.* 342(Pt 2):249-68.

Dahiya A, Wong S, Gonzalo S, Gavin M, Dean DC. (2001) Linking the Rb y polycomb pathways. *Mol Cell* 83): 557-69.

Davar D, Beumer JH, Hamieh L, Tawbi H. (2012) Role of PARP inhibitors in cancer biology y therapy. *Curr Med Chem.* 19(23):3907-21.

de Murcia G, Schreiber V, Molinete M, Saulier B, Poch O, Masson M, Niedergang C, Ménissier de Murcia J. (1994) Structure y function of poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol Cell Biochem.* 138(1-2):15-24.

de Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, Oliver FJ, Masson M, Dierich A, LeMeur M, Walztinger C, Chambon P, de Murcia G. (1997) Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice y in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(14): 7303-7.

DeGregori J, Johnson DG. (2006) Distinct y Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation y Apoptosis. *Curr Mol Med.* 6:739-48.

DeGregori J. (2002) The genetics of the E2F family of transcription factors: shared functions y unique roles. *Biochim Biophys Acta.*1602(2):131-50.

Delaney CA, Wang LZ, Kyle S, White AW, Calvert AH, Curtin NJ, Durkacz BW, Hostomsky Z, Newell DR. (2000) Potentiation of temozolomide y topotecan growth inhibition y cytotoxicity by novel poly(adenosine diphosphoribose) polymerase inhibitors in a panel of human tumor cell lines. *Clin Cancer Res.* 6(7): 2860-7.

Di Cristofano A, Pesce B, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. (1998) Pten is essential for embryonic development y tumour suppression. *Nat Genet.* 19(4):348-55.

Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C, Schurra C, Garre' M, Nuciforo PG, Bensimon A, Maestro R, Pelicci PG, d'Adda di Fagagna F. (2006) Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature.* 444(7119):638-42.

Di Stefano L, Jensen MR y Helin K (2003) E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes. *EMBO Journal* 22(23): 6289-8.

Di Stefano L, Jensen MR, Helin K. (2003) E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes. *EMBO J.* 22(23):6289-98.

Dibb NJ, Dilworth SM, Mol CD (2004). Switching on kinases: oncogenic activation of BRAF y the PDGFR family. *Nat Rev Cancer.* 4:718-727.

Dick FA, Rubin SM (2013) Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(5) : 297-306.

Digby GJ, Lober RM, Sethi PR, Lambert NA. (2006) Some G protein heterotrimer physically dissociate in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(47):17789-94.

- Dimova DK, Dyson NJ. (2005) The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene*. 24(17):2810-26.
- Dolado I, Swat A, Ajenjo N, De Vita G, Cuadrado A, Nebreda AR. (2007) p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Cell*. 11(2):191-205.
- Downward J, Yarden Y, Mayes E, Scrace G, Totty N, Stockwell P, Ullrich A, Schlessinger J, Waterfield MD. (1984) Close similarity of epidermal growth factor receptor y v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature*. 307(5951):521-7.
- Downward J. (1996) Control of ras activation. *Cancer Surv*. 27:87-100.
- Drew Y, Mulligan EA, Vong WT, Thomas HD, Kahn S, Kyle S, Mukhopadhyay A, Los G, Hostomsky Z, Plummer ER, Edmondson RJ, Curtin NJ. (2011) Therapeutic Potential of Poly(ADP-ribose) Polymerase Inhibitor AG014699 in Human Cancers With Mutated or Methylated BRCA1 or BRCA2. *J Natl Cancer Inst*. 103(4): 334-46.
- Durkacz BW, Omidiji O, Gray DA, Shall S. (1980) (ADP-ribose)_n participates in DNA excision repair. *Nature* 283:593-596.
- Dyson N (1998) The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev*. 12(15):2245-62.
- Earle E, Saxena A, MacDonald A, Hudson DF, Shaffer LG, Saffery R, Cancilla MR, Cutts SM, Howman E, Choo KH. (2000) Poly(ADP-ribose) polymerase at active centromeres y neocentromeres at metaphase. *Hum Mol Genet*. 9(2): 187-94.
- Ekblad T, Camaioni E, Schüler H, Macchiarulo A. (2013) PARP inhibitors: polypharmacology versus selective inhibition. *FEBS J*. 280(15):3563-75.
- El-Khamisy SF, Masutani M, Suzuki H, Caldecott KW. (2003) A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res*. 31(19): 5526-33.
- Euhus DM, Hudd C, LaRegina MC, Johnson FE. (1986) Tumor measurement in the nude mouse. *J Surg Oncol*. 31(4):229-34.
- Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NM, Jackson SP, Smith GC, Ashworth A. (2005) Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*. 434(7035):917-21.
- Field SJ, Tsai FY, Kuo F, Zubiaga AM, Kaelin WG Jr, Livingston DM, Orkin SH, Greenberg ME. (1996) E2F-1 functions in mice to promote apoptosis y suppress proliferation. *Cell*. 85(4):549-61.
- Filippakopoulos P, Müller S, Knapp S. (2009) SH2 domains: modulators of nonreceptor tyrosine kinase activity. *Curr Opin Struct Biol*. 19(6):643-9.

- Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, y fingerprints. *Mol Pharmacol.* 63(6):1256-72.
- Gamble MJ, Fisher RP. (2007) SET y PARP1 remove DEK from chromatin to permit access by the transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol* 14: 548-555.
- Gaubatz S, Wood JG, Livingston DM. (1998). Unusual proliferation arrest y transcriptional control properties of a newly discovered E2F family member, E2F-6. *PNAS USA.* 95(16):9190-5.
- Giangrande PH, Zhu W, Schlisio S, Sun X, Mori S, Gaubatz S, Nevins JR. (2004) A role for E2F6 in distinguishing G1/S- y G2/M-specific transcription. *Genes Dev.* 18(23):2941-51.
- Graña X, Reddy EP. (1995) Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes y cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene.* 11(2): 211-9.
- Griffin RJ, Curtin NJ, Newell DR, Golding BT, Durkacz BW, Calvert AH. (1995) The role of inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase as resistance-modifying agents in cancer therapy. *Biochimie* 77(6): 408-22.
- Guo R, Chen J, Zhu F, Biswas AK, Berton TR, Mitchell DL, Johnson DG. (2010) E2F1 localizes to sites of UV-induced DNA damage to enhance nucleotide excision repair. *J Biol Chem.* 285(25):19308-15.
- Gutkind JS. (1998) The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem.* 273:1839-1842.
- Haince JF, McDonald D, Rodrigue A, Déry U, Masson JY, Hendzel MJ, Poirier GG (2008) PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 y NBS1 proteins to multiple DNA damage sites. *J Biol Chem.* 283(2):1197-208.
- Hakmé A, Wong HK, Dantzer F, Schreiber V. (2008) The expanding field of poly(ADP-ribosylation) reactions. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' Review Series. *EMBO Rep.* 9(11):1094-100.
- Harbour JW, Dean DC. (2000) Chromatin remodeling y Rb activity. *Curr Opin Cell Biol* 12(6): 685-9.
- Harrington EA, Bruce JL, Harlow E, Dyson N. (1998) pRB plays an essential role in cell cycle arrest induced by DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(20):11945-50.
- Hassa PO, Hottiger MO. (2002). The functional role of poly (ADP-ribose) polymerase 1 as novel coactivator of NF- κ B in inflammatory disorders. *Cell Mol Life Sci.* 59(9): 1534-53.
- Hassa PO, Hottiger MO. (2008) The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. *Front Biosci.* 13:3046-82.

- Heale JT, Ball AR Jr, Schmiesing JA, Kim JS, Kong X, Zhou S, Hudson DF, Earnshaw WC, Yokomori K. (2006) Condensin I interacts with the PARP-1-XRCC1 complex y functions in DNA single-strand break repair. *Mol Cell*. 21(6): 837-48.
- Heichman KA, Roberts JM. (1994) Rules to replicate by. *Cell* 79(4): 557-62.
- Helin K, Harlow E, Fattaey A. (1993) Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol*. 13(10): 6501-8.
- Helin K, Wu CL, Fattaey AR, Lees JA, Dynlacht BD, Ngwu C, Harlow E. (1993) Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 y DP-1 leads to cooperative trans-activation. *Genes Dev*. 7(10): 1850-61.
- Hershko T, Korotayev K, Polager S, Ginsberg D. (2006) E2F1 modulates p38 MAPK phosphorylation via transcriptional regulation of ASK1 y Wip1. *J Biol Chem*. 281(42):31309-16.
- Hottiger MO, Hassa PO, Lüscher B, Schüler H, Koch-Nolte F. (2010) Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends Biochem Sci*. 35(4):208-19.
- Hsiao SJ, Smith S. (2008) Tankyrase function at telomeres, spindle poles, y beyond. *Biochimie*. 90(1):83-92.
- Hu N, Gutschmann A, Herbert DC, Bradley A, Lee WH, Lee EY. (1994) Heterozygous Rb-1 delta 20/+mice are predisposed to tumors of the pituitary gland with a nearly complete penetrance. *Oncogene*. 9(4):1021-7.
- Huang K, Tidyman WE, Le KU, Kirsten E, Kun E, Ordahl CP. (2004) Analysis of nucleotide sequence-dependent DNA binding of poly(ADP-ribose) polymerase in a purified system. *Biochemistry* 43: 217-223.
- Huletsky A, de Murcia G, Muller S, Hengartner M, Ménard L, Lamarre D, Poirier GG. (1989). The effect of poly(ADP- ribosyl)ation on native y H1-depleted chromatin. A role of poly (ADP-ribosyl)ation on core nucleosome structure. *J. Biol. Chem*. 264: 8878-8886.
- laquinta PJ, Lees JA. (2007) Life y death decisions by the E2F transcription factors. *Curr Opin Cell Biol*. 19(6):649-57.
- Iglesias P, Costoya JA. (2014) The antimitotic potential of PARP inhibitors, an unexplored therapeutic alternative. *Curr Top Med Chem*. 14(20):2346-65.
- Jackman J, O'Connor PM. (2001) Methods for synchronizing cells at specific stages of the cell cycle. *Curr Protoc Cell Biol*. Capítulo 8:Unidad 8.3.
- Jacks T, Fazeli A, Schmitt EM, Bronson RT, Goodell MA, Weinberg RA. (1992) Effects of an rb mutation in the mouse. *Nature*. 359(6393):295-300.
- Johnson DG, Schwarz JK, Cress WD, Nevins JR. (1993) Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature*. 365(6444):349-52.

Johnson N, Cai D, Kennedy RD, Pathania S, Arora M, Li YC, D'Andrea AD, Parvin JD, Shapiro GI. (2009) Cdk1 Participates in BRCA1-Dependent S Phase Checkpoint Control in Response to DNA Damage. *Mol Cell*. 35(3): 327-39.

Johnson N, Li YC, Walton ZE, Cheng KA, Li D, Rodig SJ, Moreau LA, Unitt C, Bronson RT, Thomas HD, Newell DR, D'Andrea AD, Curtin NJ, Wong KK, Shapiro GI. (2011) Compromised CDK1 activity sensitizes BRCA-proficient cancers to PARP inhibition. *Nat Med*. 17(7): 875-82.

Ju BG, Lunyak VV, Perissi V, Garcia-Bassets I, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG. (2006). A topoisomerase IIbeta-mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science* 312: 1798–1802.

Ju BG, Solum D, Song EJ, Lee KJ, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG (2004) Activating the PARP-1 sensor component of the groucho/TLE1 corepressor complex mediates a CaMKinase IIdelta-dependent neurogenic gene activation pathway. *Cell* 119: 815-829.

Juarez-Salinas H, Sims JL, Jacobson MK. (1979) Poly (ADP-ribose) levels in carcinogen-treated cells. 282:740-741.

Kaelin WG Jr, Krek W, Sellers WR, DeCaprio JA, Ajchenbaum F, Fuchs CS, Chittenden T, Li Y, Farnham PJ, Blanas MA, *et al.*, (1992) Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. *Cell*. 70(2):351-64.

Kanai M, Tong WM, Sugihara E, Wang ZQ, Fukasawa K, Miwa M. (2003) Involvement of Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 y Poly(ADP-Ribosyl)ation in Regulation of Centrosome Function. *Mol Cell Biol*. 23(7): 2451-62.

Kanai M, Tong WM, Wang ZQ, Miwa M. (2007) Haploinsufficiency of poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated poly(ADP-ribose) for centrosome duplication. *Biochemical Pharmacology* 359: 426–430.

Kanai M, Uchida M, Hanai S, Uematsu N, Uchida K, Miwa M. (2000) Poly(ADP-ribose) Polymerase Localizes to the Centrosomes y Chromosomes. *Biochem Biophys Res Commun*. 278(2): 385-9.

Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. (1993) Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*. 53(17):3976-85.

Kawaichi M, Ueda K, Hayaishi O. (1981) Multiple autopoly(ADP-ribose)ation of rat liver poly(ADP-ribose) synthetase. Mode of modification y properties of automodified synthetase. *J Biol Chem*. 256(18):9483-9.

Kim MY, Mauro S, Gévry N, Lis JT, Kraus WL. (2004) NAD⁺-Dependent Modulation of Chromatin Structure y Transcription by Nucleosome Binding Properties of PARP-1. *Cell* 119(6): 803-14.

Kim MY1, Zhang T, Kraus WL. (2005). Poly(ADP-ribose)ation by PARP- 1: 'PAR-laying' NAD⁺ into a nuclear signal. *Genes Dev*. 19: 1951–1967.

- Kinoshita T, Nakanishi I, Warizaya M, Iwashita A, Kido Y, Hattori K, Fujii T. (2004) Inhibitor-induced structural change of the active site of human poly(ADP-ribose) polymerase. *FEBS Lett.* 556(1-3): 43-6.
- Kinzler KW, Vogelstein B. (1993) The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 9(4):138-41.
- Klenova E, Ohlsson R. (2005) Poly(ADP-ribosylation) y epigenetics. Is CTCF PART of the plot? *Cell Cycle* 4: 96-101.
- Knudsen ES, Knudsen KE. (2008) Tailoring to RB: tumour suppressor status y therapeutic response. *Nat Rev Cancer.* 8(9):714-24.
- Kohn MJ, Bronson RT, Harlow E, Dyson NJ, Yamasaki L. (2003) Dp1 is required for extra-embryonic development. *Development.* 130(7): 1295-305.
- Kohn MJ, Leung SW, Criniti V, Agromayor M, Yamasaki L. (2004) Dp1 is largely dispensable for embryonic development. *Mol Cell Biol.* 24(16): 7197-205.
- Kornberg RD, Lorch Y. (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell.* 98(3):285-94.
- Kraus WL, Lis JT. (2003). PARP goes transcription. *Cell* 113: 677-683.
- Kraus WL. (2008). Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, y insulation. *Curr Opin Cell Biol.* 20: 294-302.
- Krishnakumar R, Gamble MJ, Frizzell KM, Berrocal JG, Kininis M, Kraus WL. (2008). Reciprocal binding of PARP-1 y histone H1 at promoters specifies transcriptional outcomes. *Science* 319: 819-821.
- Lapucci A, Pittelli M, Rapizzi E, Felici R, Moroni F, Chiarugi A. (2011) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a nuclear epigenetic regulator of mitochondrial DNA repair y transcription. *Mol Pharmacol.* 79(6):932-40.
- Lee EY, Chang CY, Hu N, Wang YC, Lai CC, Herrup K, Lee WH, Bradley A. (1992). Mice deficient for Rb are nonviable y show defects in neurogenesis y haematopoiesis. *Nature* 359, 288-294.
- Lee EY, Hu N, Yuan SS, Cox LA, Bradley A, Lee WH, Herrup K. (1994). Dual roles of the retinoblastoma protein in cell cycle regulation y neuron differentiation. *Genes Dev.* 8:2008-2021.
- Lemmon MA, Schlessinger J. (2010) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 141(7): 1117-34.
- Leone G, Nuckolls F, Ishida S, Adams M, Sears R, Jakoi L, Miron A, Nevins JR. (2000) Identification of a novel E2F3 product suggests a mechanism for determining specificity of repression by Rb proteins. *Mol Cell Biol.* 20(10):3626-32.

- Leung CC, Glover JN (2011) BRCT domains: easy as one, two, three. *Cell Cycle*. 10(15):2461-70.
- Li H, Goldstein BM. (1992) Carboxamide group conformation in the nicotinamide y thiazole-4-carboxamide rings: implications for enzyme binding. *J Med Chem*. 35(19): 3560-7.
- Li J, Ran C, Li E, Gordon F, Comstock G, Siddiqui H, Cleghorn W, Chen HZ, Kornacker K, Liu CG, Pandit SK, Khanizadeh M, Weinstein M, Leone G, de Bruin A (2008) Synergistic function of E2F7 y E2F8 is essential for cell survival y embryonic development. *Dev Cell*. 14(1):62-75.
- Li Y, Slansky JE, Myers DJ, Drinkwater NR, Kaelin WG, Farnham PJ. Cloning, chromosomal location, y characterization of mouse E2F1. (1994) *Mol Cell Biol*. 14(3):1861-9.
- Lipinski MM, Jacks T. (1999) The retinoblastoma gene family in differentiation y development. *Oncogene* 18(55): 7873-82.
- Liu K, Lin FT, Ruppert JM, Lin WC. (2003) Regulation of E2F1 by BRCT domain-containing protein TopBP1. *Mol Cell Biol*. 23(9): 3287-304.
- Loeffler PA, Cuneo MJ, Mueller GA, DeRose EF, Gabel SA, London RE. (2011) Structural studies of the PARP-1 BRCT domain. *BMC Struct Biol*. 11:37.
- Luger K, Richmond TJ. (1998) The histone tails of the nucleosome. *Curr Opin Genet Dev*. 8(2):140-6.
- Lukas J, Petersen BO, Holm K, Bartek J, Helin K. (1996) Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry y overcomes p16INK4A-mediated growth suppression. *Mol Cell Biol*. 16(3):1047-57.
- Macleod KF. (2008) The role of the RB tumour suppressor pathway in oxidative stress responses in the haematopoietic system. *Nat Rev Cancer* 8(10): 769-81.
- Mäkinen M, Hillukkala T, Tuusa J, Reini K, Vaara M, Huang D, Pospiech H, Majuri I, Westerling T, Mäkelä TP, Syväoja JE. (2001) BRCT domain-containing protein TopBP1 functions in DNA replication y damage response. *J Biol Chem*. 276(32): 30399-406.
- Malumbres M, Barbacid M (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer*. 1(3):222-31.
- Manning AL, Dyson NJ (2012) RB: mitotic implications of a tumour suppressor. *Nat Rev Cancer* 12(3): 220-6.
- Marino S, Vooijs M, van Der Gulden H, Jonkers J, Berns A. (2000) Induction of medulloblastomas in p53-null mutant mice by somatic inactivation of Rb in the external granular layer cells of the cerebellum. *Genes Dev*. 14(8):994-1004.
- Marx J. (1994) Oncogenes reach a milestone. *Science*. 266(5193):1942-1944.
- Masson M, Niedergang C, Schreiber V, Muller S, Menissier-de Murcia J, de Murcia G.

(1998) XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase y negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol Cell Biol.* 18(6): 3563-3571.

Masutani M, Nozaki T, Nishiyama E, Shimokawa T, Tachi Y, Suzuki H, Nakagama H, Wakabayashi K, Sugimura T. (1999) Function of poly(ADP-ribose) polymerase in response to DNA damage: gene-disruption study in mice. *Mol Cell Biochem.* (1-2): 149-152.

Mateo J, Ong M, Tan DS, Gonzalez MA, de Bono JS. (2013) Appraising iniparib, the PARP inhibitor that never was--what must we learn? *Nat Rev Clin Oncol.* 10(12): 688-96.

Mathis G, Althaus FR. (1987). Release of core DNA from nucleosomal core particles following (ADP-ribose)_n-modification in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143: 1049-1054.

McCabe N, Turner NC, Lord CJ, Kluzek K, Bialkowska A, Swift S, Giavara S, O'Connor MJ, Tutt AN, Zdzienicka MZ, Smith GC, Ashworth A. (2006) Deficiency in the Repair of DNA Damage by Homologous Recombination y Sensitivity to Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibition. *Cancer Res.* 66(16): 8109-15.

Mendes-Pereira AM, Martin SA, Brough R, McCarthy A, Taylor JR, Kim JS, Waldman T, Lord CJ, Ashworth A. (2009) Synthetic lethal targeting of PTEN mutant cells with PARP inhibitors. *EMBO Mol Med* 1(6-7): 315-322.

Mendoza-Alvarez H, Alvarez-Gonzalez R. (2001). Regulation of p53 sequence-specific DNA-binding by covalent poly(ADP-ribosylation). *J. Biol. Chem.* 276: 36425-36430.

Ménissier-de Murcia J, Mark M, Wendling O, Wynshaw-Boris A, de Murcia G. (2001) Early embryonic lethality in PARP-1 Atm double-mutant mice suggests a functional synergy in cell proliferation during development. *Mol Cell Biol.* 21(5): 1828-32.

Ménissier de Murcia J, Ricoul M, Tartier L, Niedergang C, Huber A, Dantzer F, Schreiber V, Amé JC, Dierich A, LeMeur M, Sabatier L, Chambon P, de Murcia G. (2003) Functional interaction between PARP-1 y PARP-2 in chromosome stability y embryonic development in mouse. *EMBO J.* 22(9): 2255-63.

Ménissier-de Murcia J, Molinete M, Gradwohl G, Simonin F, de Murcia G. (1989) Zinc-binding domain of poly(ADP-ribose)polymerase participates in the recognition of single strand breaks on DNA. *J Mol Biol.* 210(1):229-33.

Merlino GT, Xu YH, Ishii S, Clark AJ, Semba K, Toyoshima K, Yamamoto T, Pastan I. (1984) Amplification y enhanced expression of the epidermal growth factor receptor gene in A431 human carcinoma cells. *Science.* 224(4647):417-9.

Messner S, Altmeyer M, Zhao H, Pozivil A, Roschitzki B, Gehrig P, Rutishauser D, Huang D, Caflisch A, Hottiger MO. (2010) PARP1 ADP-ribosylates lysine residues of the core histone tails. *Nucleic Acids Res.* 38(19):6350-62.

Milam KM, Cleaver JE. (1984) Inhibitors of poly(adenosine diphosphate-ribose) synthesis: effect on other metabolic processes. *Science.* 223(4636): 589-91.

Monaco L, Kolthur-Seetharam U, Loury R, Murcia JM, de Murcia G, Sassone-Corsi P. (2005) Inhibition of Aurora-B kinase activity by poly(ADP-ribosylation) in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(40): 14244-8.

Moses K, Harris AL, Durkacz BW. (1988) Synergistic enhancement of 6-thioguanine cytotoxicity by ADP-ribosyltransferase inhibitors. *Cancer Res.* 48(20): 5650-4.

Moses K, Willmore E, Harris AL, Durkacz BW. (1990) Correlation of enhanced 6-mercaptopurine cytotoxicity with increased phosphoribosylpyrophosphate levels in Chinese hamster ovary cells treated with 3-aminobenzamide. *Cancer Res.* 50(7): 1992-6.

Müller H, Moroni MC, Vigo E, Petersen BO, Bartek J, Helin K. (1997) Induction of S-phase entry by E2F transcription factors depends on their nuclear localization. *Mol Cell Biol.* 17(9):5508-20.

Muller, H. y Helin, K. (2000) The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation. *Biochim. Biophys. Acta* 1470, M1-12.

Na Z, Peng B, Ng S, Pan S, Lee JS, Shen HM, Yao SQ. (2015) A Small-Molecule Protein-Protein Interaction Inhibitor of PARP1 That Targets Its BRCT Domain. *Angew Chem Int Ed Engl.* 54(8):2515-9.

Nevins, J.R. (2001) The Rb/E2F pathway y cancer. *Hum. Mol. Genet.* 10, 699-703.

Nielsen SJ, Schneider R, Bauer UM, Bannister AJ, Morrison A, O'Carroll D, Firestein R, Cleary M, Jenuwein T, Herrera RE, Kouzarides T. (2001) Rb targets histone H3 methylation y HP1 to promoters. *Nature* 412(6846): 561-5.

Nirodi C, NagDas S, Gygi SP, Olson G, Aebersold R, Richmond A. (2001) A role for poly(ADP-ribose) polymerase in the transcriptional regulation of the melanoma growth stimulatory activity (CXCL1) gene expression. *J Biol Chem* 276: 9366-9374.

Nurse P. (1994) Ordering S phase y M phase in the cell cycle. *Cell* 79(4): 547-50.

O'Sullivan CC, Moon DH, Kohn EC, Lee JM. (2014) Beyond Breast y Ovarian Cancers: PARP Inhibitors for BRCA Mutation-Associated y BRCA-Like Solid Tumors. *Front Oncol.* 4:42.

Okano S, Lan L, Caldecott KW, Mori T, Yasui A. (2003) Spatial y temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells. *Mol Cell Biol.* 23(11): 3974-81.

Olabisi OA, Soto-Nieves N, Nieves E, Yang TT, Yang XY, Yu RY, Suk HY, Macian F, Chow CW. (2008) Regulation of transcription factor NFAT by ADP-ribosylation. *Mol Cell Biol* 28: 2860-2871

Oliver CL, Bauer JA, Wolter KG, Ubell ML, Narayan A, O'Connell KM, Fisher SG, Wang S, Wu X, Ji M, Carey TE, Bradford CR. (2004) In vitro effects of the BH3 mimetic, (-)-gossypol, on head y neck squamous cell carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 10(22):7757-63.

- Parma J, Duprez L, Van Sande J, Cochaux P, Gervy C, Mockel J, Dumont J, Vassart G. (1993) Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas. *Nature*. 365(6447):649-51.
- Patel A, De Lorenzo SB, Flatten KS, Poirier GG, Kaufmann SH. (2012) Failure of iniparib to inhibit poly(ADP-Ribose) polymerase in vitro. *Clin Cancer Res*. 18(6): 1655-62.
- Pavri R, Lewis B, Kim TK, Dilworth FJ, Erdjument-Bromage H, Tempst P, de Murcia G, Evans R, Chambon P, Reinberg D. (2005) PARP- 1 determines specificity in a retinoid signaling pathway via direct modulation of Mediator. *Mol Cell* 18: 83-96.
- Petrucco S, Volpi G, Bolchi A, Rivetti C, Ottonello S. (2002) A nick-sensing DNA 3'-repair enzyme from Arabidopsis. *J Biol Chem*. 277(26):23675-83.
- Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3:639-650.
- Pihan GA, Purohit A, Wallace J, Knecht H, Woda B, Quesenberry P, Doxsey SJ. (1998) Centrosome defects y genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res*. 58(17): 3974-85.
- Pleschke JM, Kleczkowska HE, Strohm M, Althaus FR. (2000) Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J Biol Chem*. 275(52):40974-80.
- Plummer ER. (2006) Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in cancer. *Curr Opin Pharmacol*. 6(4): 364-8.
- Poirier GG, de Murcia G, Jongstra-Bilen J, Niedergang C, Mandel P. (1982). Poly(ADP-ribosylation) of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 3423-3427.
- Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. (2011) RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer*. 11(11):761-74.
- Rayman JB, Takahashi Y, Indjeian VB, Dannenberg JH, Catchpole S, Watson RJ, te Riele H, Dynlacht BD. (2002) E2F mediates cell cycle-dependent transcriptional repression in vivo by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex. *Genes Dev*. 16(8):933-47.
- Reale A, Matteis GD, Galleazzi G, Zampieri M, Caiafa P. (2005) Modulation of DNMT1 activity by ADP-ribose polymers. *Oncogene* 24: 13-19.
- Realini CA, Althaus FR. (1992). Histone shuttling by poly (ADP-ribosylation). *J. Biol. Chem*. 267: 18858-18865.
- Reeder RH, Ueda K, Honjo T, Nishizuka Y, Hayaishi O (1967) Studies on the polymer of adenosine diphosphate ribose. II. Characterization of the polymer. *J Biol Chem*. 242(13): 3172-3179.
- Reis T, Edgar BA. (2004) Negative regulation of dE2F1 by cyclin-dependent kinases controls cell cycle timing. *Cell*. 117(2):253-64.

- Rolli V, O'Farrell M, Ménissier-de Murcia J, de Murcia G. (1997) Random mutagenesis of the poly(ADP-ribose) polymerase catalytic domain reveals amino acids involved in polymer branching. *Biochemistry*. 36(40): 12147-54.
- Ruf A, Menissier de Murcia J, de Murcia G, Schulz GE. (1996) Structure of the catalytic fragment of poly (AD-ribose) polymerase from chicken. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(15): 7481-5.
- Salic A, Mitchison TJ. (2008) A chemical method for fast y sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(7):2415-20.
- Saxena A, Saffery R, Wong LH, Kalitsis P, Choo KH. (2002) Centromere proteins Cenpa, Cenpb, y Bub3 interact with poly(ADP-ribose) polymerase-1 protein y are poly(ADP-ribosyl)ated. *J Biol Chem*. 277(30): 26921-6.
- Saxena A, Wong LH, Kalitsis P, Earle E, Shaffer LG, Choo KH. (2002) Poly (ADP-ribose) polymerase 2 localizes to mammalian active centromeres y interacts with PARP-1, Cenpa, Cenpb y Bub3, but not Cenpc. *Hum Mol Genet*. 11(19): 2319-29.
- Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, Wiesmüller L, Lautwein A, Schmitz F, Wittinghofer A. (1997) The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation y its loss in oncogenic Ras mutants. *Science*. 277(5324):333-8.
- Schreiber V, Amé JC, Dollé P, Schultz I, Rinaldi B, Fraulob V, Ménissier-de Murcia J, de Murcia G. (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 y XRCC1. *J Biol Chem*. 277(25):23028-36.
- Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G. (2006) Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7(7):517-28.
- Seoane M, Iglesias P, Gonzalez T, Dominguez F, Fraga M, Aliste C, Forteza J, Costoya JA. (2008) *PLoS One*. 2008;3(11):e3632.
- Shall S. (1975) Proceedings: Experimental manipulation of the specific activity of poly(ADP-ribose) polymerase. *J Biochem*. 77(1): 2p.
- Shan B, Lee WH. (1994) Deregulated expression of E2F-1 induces S-phase entry y leads to apoptosis. *Mol Cell Biol*. 14(12):8166-73.
- Sherr CJ (1996). Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672–1677.
- Sherr CJ. (1994) G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79(4): 551-5.
- Shi L, Li M, Lin Q, Qi X, Su B. (2013) Functional divergence of the brain-size regulating gene MCPH1 during primate evolution y the origin of humans. *BMC Biol*. 11:62.
- Shieh WM, Amé JC, Wilson MV, Wang ZQ, Koh DW, Jacobson MK, Jacobson EL. (1998) Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers. *J Biol Chem*. 273(46):30069-72.

- Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Boulares AH, Hickey RJ, Malkas LH, Coll JM, Smulson ME. (1998) Regulation of the expression or recruitment of components of the DNA synthesome by poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochemistry*. 37(26): 9363-70.
- Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Luo R, Samara R, Espinoza LA, Hassa PO, Hottiger MO, Smulson ME. (2003) PARP-1 binds E2F-1 independently of its DNA binding y catalytic domains, y acts as a novel coactivator of E2F-1-mediated transcription during re-entry of quiescent cells into S phase. *Oncogene*. 22(52): 8460-71.
- Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Luo R, Smulson ME. (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase upregulates E2F-1 promoter activity y DNA pol alpha expression during early S phase. *Oncogene*. 18(36): 5015-23.
- Slansky JE, Farnham PJ. (1993) Introduction to the E2F family: protein structure y gene regulation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 208:1-30.
- Smith S. (2001) The world according to PARP. *Trends in Biochemical Sciences* 26:174-179.
- Soldatenkov VA, Chasovskikh S, Potaman VN, Trofimova I, Smulson ME, Dritschilo A: Transcriptional repression by binding of poly(ADP-ribose) polymerase to promoter sequences. *J Biol Chem* 2002, 277: 665-670.
- Stevaux O, Dyson NJ. (2002) A revised picture of the E2F transcriptional network y RB function. *Curr Opin Cell Biol*. 14(6):684-91.
- Suto MJ, Turner WR, Arundel-Suto CM, Werbel LM, Sebolt-Leopold JS. (1991) Dihydroisoquinolinones: the design y synthesis of a new series of potent inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase. *Anticancer Drug Des*. 6(2): 107-17.
- Swift S, Lorens J, Achacoso P, Nolan GP. (2001) Rapid production of retroviruses for efficient gene delivery to mammalian cells using 293T cell-based systems. *Curr Protoc Immunol*. Chapter 10:Unit 10.17C.
- Todaro GJ, Green H. (1963) Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture y their development into established lines. *J Cell Biol*. 17:299-313.
- Trotman LC, Niki M, Dotan ZA, Koutcher JA, Di Cristofano A, Xiao A, Khoo AS, Roy-Burman P, Greenberg NM, Van Dyke T, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. (2003) Pten dose dictates cancer progression in the prostate. *PLoS Biol*. 1(3): E59.
- Tsai KY, Hu Y, Macleod KF, Crowley D, Yamasaki L, Jacks T. (1998) Mutation of E2f-1 suppresses apoptosis y inappropriate S phase entry y extends survival of Rb-deficient mouse embryos. *Mol Cell*. 2(3):293-304.
- Turner N, Tutt A, Ashworth A. (2004) Hallmarks of "BRCAness" in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer*. 4(10): 814-9.
- Uhrbom L, Nerio E, Holland EC. (2004) Dissecting tumor maintenance requirements using bioluminescence imaging of cell proliferation in a mouse glioma model. *Nat Med*. 10(11):1257-60.

- van Holde KE (1988) Chromatin. Series in molecular biology. Ed. Springer-Verlag.
- Vandel L, Nicolas E, Vaute O, Ferreira R, Ait-Si-Ali S, Trouche D. (2001) Transcriptional repression by the retinoblastoma protein through the recruitment of a histone methyltransferase. *Mol Cell Biol* 21(19): 6484-94.
- Venkatakrishnan AJ, Deupi X, Lebon G, Tate CG, Schertler GF, Babu MM. (2013) Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*. 494(7436):185-94
- Vetter IR, Wittinghofer A. (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*. 294(5545):1299-304.
- Wacker DA, Ruhl DD, Balagamwala EH, Hope KM, Zhang T, Kraus WL. (2007). The DNA binding y catalytic domains of poly(ADP-ribose) polymerase 1 cooperate in the regulation of chromatin structure y transcription. *Mol. Cell. Biol.* 27: 7475–7485.
- Wahlberg E, Karlberg T, Kouznetsova E, Markova N, Macchiarulo A, Thorsell AG, Pol E, Frostell Å, Ekblad T, Öncü D, Kull B, Robertson GM, Pellicciari R, Schüler H, Weigelt J. (2012) Family-wide chemical profiling y structural analysis of PARP y tankyrase inhibitors. *Nat Biotechnol.* 30(3):283-8.
- Wallace JA, Felsenfeld G. (2007) We gather together: insulators y genome organization. *Curr Opin Genet Dev* 17: 400-407.
- Wang ZQ, Auer B, Stingl L, Berghammer H, Haidacher D, Schweiger M, Wagner EF. (1995) Mice lacking ADPRT y poly(ADP-ribosylation) develop normally but are susceptible to skin disease. *Genes Dev.* 9(5): 509-20.
- Wang M, Wu W, Wu W, Rosidi B, Zhang L, Wang H, Iliakis G. (2006) PARP-1 y Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res.* 34(21):6170-82.
- Wang X, Howell CP, Chen F, Yin J, Jiang Y. (2009) Gossypol - A polyphenolic compound from cotton plant. *Adv Food Nutr Res.* 58:215-63.
- Weinberg RA (1995) The retinoblastoma protein y cell cycle control. *81(3): 323-30.*
- Weinberg RA (2013) *The Biology of Cancer*, 2^{da} Edición (inglés). Ed. Garland Science.
- Williams BO, Remington L, Albert DM, Mukai S, Bronson RT, Jacks T. (1994). Cooperative tumorigenic effects of germline mutations in Rb y p53. *Nature Genetics* 7, 480–484.
- Woodhouse BC, Dianov GL. (2008) Poly ADP-ribose polymerase-1: an international molecule of mystery. *DNA Repair (Amst).* 7(7):1077-86.
- Wu L, de Bruin A, Saavedra HI, Starovic M, Trimboli A, Yang Y, Opavska J, Wilson P, Thompson JC, Ostrowski MC, Rosol TJ, Woollett LA, Weinstein M, Cross JC, Robinson ML, Leone G. (2003) Extra-embryonic function of Rb is essential for embryonic development y viability. *Nature.* 421(6926):942-947.

Wu L, Timmers C, Maiti B, Saavedra HI, Sang L, Chong GT, Nuckolls F, Giangrande P, Wright FA, Field SJ, Greenberg ME, Orkin S, Nevins JR, Robinson ML, Leone G. (2001) The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature*. 414(6862):457-62.

Yamane K, Kawabata M, Tsuruo T. (1997) A DNA-topo- isomerase-II-binding protein with eight repeating regions similar to DNA-repair enzymes and to a cell-cycle regulator. *Eur J Biochem* 250:794-799.

Yamane K, Wu X, Chen J. (2002) A DNA damage-regulated BRCT-containing protein, TopBP1, is required for cell survival. *Mol Cell Biol*. 22(2): 555-66.

Yamasaki L, Jacks T, Bronson R, Goillot E, Harlow E, Dyson NJ. (1996) Tumor induction y tissue atrophy in mice lacking E2F-1. *Cell*, 85(4):537-48.

Yamasaki L1, Bronson R, Williams BO, Dyson NJ, Harlow E, Jacks T. (1998) Loss of E2F-1 reduces tumorigenesis y extends the lifespan of Rb1(+/-) mice. *Nat Genet*. 18(4):360-364.

Yelamos J, Farres J, Llacuna L, Ampurdanes C, Martin-Caballero J. (2011) PARP-1 y PARP-2: New players in tumour development. *Am J Cancer Res*. 1(3): 328-346.

Yélamos J, Schreiber V, Dantzer F. (2008) Toward specific functions of poly(ADP-ribose) polymerase-2. *Trends Mol Med*. (4):169-178.

Yu W, Gijjala V, Pant V, Chernukhin I, Whitehead J, Docquier F, Farrar D, Tavoosidana G, Mukhopadhyay R, Kanduri C *et al.*, (2004) Poly(ADP-ribose)ylation regulates CTCF-dependent chromatin insulation. *Nat Genet* 36: 1105-1110.

Yu X, Chini CC, He M, Mer G, Chen J. (2003) The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. *Science*. 302(5645):639-642.

Yusufzai TM, Tagami H, Nakatani Y, Felsenfeld G. (2004) CTCF tethers an insulator to subnuclear sites, suggesting shared insulator mechanisms across species. *Mol Cell* 13: 291-298.

Zaniolo K, Desnoyers S, Leclerc S, Guerin SL. (2007) Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) gene expression through the post-translational modification of Sp1: a nuclear target protein of PARP-1. *BMC Mol Biol* 8: 96.

Zardo G, Reale A, De Matteis G, Buontempo S, Caiafa P. (2003) A role for poly(ADP-ribose)ylation in DNA methylation. *Biochem Cell Biol* 81: 197-208.

Zhang Z, Hildebrandt EF, Simbulan-Rosenthal CM, yerson MG. (2002) Sequence-specific binding of poly(ADP-ribose) polymerase-1 to the human T cell leukemia virus type-I tax responsive element. *Virology* 296: 107-116.

Zheng L, Baumann U, Reymond JL. (2004) An efficient one-step site-directed y site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res*. 32(14):e115.

Ziebold U, Lee EY, Bronson RT, Lees JA. (2003) E2F3 loss has opposing effects on different pRB-deficient tumors, resulting in suppression of pituitary tumors but metastasis of medullary thyroid carcinomas. *Mol Cell Biol.* 23(18):6542-52.





“El medio forma parte de la verdad, tanto como el resultado. Es preciso que la búsqueda de la verdad sea a su vez verdadera; la búsqueda verdadera es la verdad desplegada, cuyos miembros dispersos se reúnen en el resultado”