



Universitat de Lleida
Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agrària



Estudio de la interacción entre la quinasa de ciclo CDK4 y la proteína multifuncional PHB2.

Memoria del Trabajo final de grado

David López Alcalde

Trabajo dirigido por el Dr. **Francisco Ferrezuelo**, del Departamento
de Ciencias Médicas Básicas de la Universitat de Lleida

Francisco Ferrezuelo Muñoz

David López Alcalde

Lleida, 1 de julio del 2014

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| Agradecimientos | 2 |
| Abstract | 3 |
| Introducción | |
| 1. Complejo ciclina D1-CDK4 | 4 |
| 2. La vía ciclina-CDK-pRB- E2F | 5 |
| 3. Prohibitinas | 6 |
| Objetivos | 8 |
| Materiales y métodos | |
| 1. Cultivos | 9 |
| 2. Transfección | 10 |
| 3. Inmunoprecipitación con partículas magnéticas | 10 |
| 4. Western Blot | 11 |
| 5. Fraccionamiento celular para aislar las mitocondrias | 13 |
| 6. Extracción de proteínas y cuantificación | 15 |
| Resultados | |
| 1. Interacción entre CDK4 y PHB2 | 16 |
| 2. Localización subcelular de las proteínas de interés | 20 |
| Discusión | 23 |
| Conclusiones | 26 |
| Bibliografía | 27 |

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo empezó hace unos meses gracias al Dr. Francisco Ferrezuelo, quien decidió aceptar a un novato en su laboratorio para ayudarme a seguir despertando su entusiasmo por la ciencia. Él ha sido mi tutor y mentor, quien me ha ayudado en todo momento, dándome la confianza necesaria y aportándome todo su conocimiento para que aprovechara mi estancia en el laboratorio. Posteriormente, ha tutorado este Trabajo Final de Grado, el cual es tanto mío como suyo, ya que ha volcado todos sus esfuerzos en que quedara un trabajo inmejorable y que de éste siguiera aprendiendo con cada sugerencia que me proponía. Gracias por haber compartido conmigo tiempo, esfuerzo y muchos conocimientos.

Además, con él hay un grupo de personas que son como una familia, que me acogieron como uno más desde el primer día. Por todos los buenos momentos que he pasado, las experiencias tanto profesionales como personales que he disfrutado, la rutina que seguí en el laboratorio, el descubrir la cara no teórica de la ciencia, pero a la vez poder llevar a la práctica todos los conocimientos aprendidos a lo largo de estos años de carrera, tengo que dar las gracias a todas y cada una de las personas que componen el grupo de Ciclo celular del IRB Lleida. Gracias por hacerme tan fácil y llevadera mi primera incorporación al mundo laboral, y por haber contribuido de manera tan significativa en mi vida personal. Merecen una mención especial el Dr. Eloi Garí, por ser una fuente de conocimientos y respuestas, y Tània Cemeli, quien desde el primer día me ayudó en todo y amenizó los cortos y largos descansos.

Muchas gracias a todos. Gracias por esta experiencia inolvidable.

ABSTRACT

La quinasa dependiente de ciclina CDK4 tiene un papel bien documentado en la regulación del ciclo celular. Aparte, existen sólidos indicios que la involucran en la regulación metabólica, quizá coordinando los cambios metabólicos necesarios entre quiescencia y proliferación. Previamente en nuestro laboratorio habíamos descrito una interacción entre CDK4 y prohibitina 2 (PHB2). Las prohibitinas son proteínas bien conservadas evolutivamente a las que se ha asignado una variedad dispar de funciones, entre ellas participar en vías de señalización celular que afectan al ciclo celular y la proliferación, y ser necesarias para el desarrollo normal de las mitocondrias y el mantenimiento de la función mitocondrial. En este trabajo, demostramos mediante inmunoprecipitaciones in vivo y fraccionamiento celular respectivamente la interacción entre CDK4 y PHB2 en distintos modelos celulares bajo condiciones endógenas de expresión y la localización de ambas proteínas en las mitocondrias. Nuestros resultados sugieren que dicha interacción debe ser relativamente débil, indican que no depende de ciclina D1 - la principal ciclina asociada a CDK4 y que podría estar compitiendo con PHB2 por la unión a esta - y son compatibles con una interacción a nivel mitocondrial. Nosotros proponemos que el papel esencial que CDK4 juega en la fisiología de la mitocondria podría estar mediado por su interacción con PHB2. Futuras investigaciones serán necesarias para apoyar o refutar nuestra hipótesis y para ahondar en el mecanismo molecular de la enigmática relación entre CDK4 y las prohibitinas.

INTRODUCCIÓN

1. COMPLEJO CICLINA D1-CDK4

Las diferentes etapas del ciclo celular se dan gracias a la regulación de la actividad de los complejos formados por las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Las células de mamífero contienen genes que codifican tres ciclinas muy similares del tipo D (D1, D2, D3) (Sherr, 1995), que se expresan de forma específica de tejido (Matsushime et al., 1991; Sherr, 1995; Xiong et al., 1991) y se asocian a las quinasas CDK4 y CDK6 para formar un complejo activo (Bockstaele et al., 2006; Matsushime et al., 1994). Los complejos de ciclina D1-CDK4/6 son reguladores del inicio del ciclo celular. La ciclina D1 es la más estudiada por el hecho de que su amplificación génica es la segunda más común en tumores humanos con diferentes orígenes histológicos (Beroukhim et al., 2010).

Hasta ahora, se ha descrito que el complejo ciclina D1- CDK4 realiza dos funciones importantes en el inicio del ciclo celular. Una de las funciones es catalítica, e involucra la inactivación de la proteína del retinoblastoma (pRB) que es un inhibidor del factor de transcripción E2F (Kato et al., 1993) (Figura 1). La fosforilación de pRB provoca la liberación de E2F y así se consigue la activación de los genes necesarios para la transición G1/S y para la fase S, como por ejemplo, la ciclina E. Otra función del complejo ciclina D1-CDK4 es el secuestro de los miembros de la familia de las proteínas inhibidoras de CDKs, CIP/KIP, lo que facilita la activación del complejo ciclina E-CDK2 y permite la entrada en fase S, donde tiene lugar la replicación del DNA (Sherr and Roberts, 1999). Los complejos de ciclinas y CDKs fosforilan una gran variedad de proteínas que son necesarias para el control del ciclo celular, pero también para el control del crecimiento.

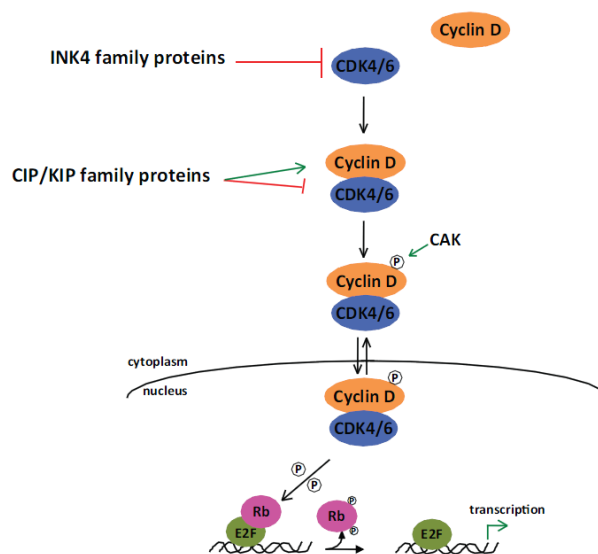


Figura 1. Regulación de CDK4 y activación durante la progresión del ciclo celular.

2. LA VÍA CICLINA-CDK-pRB- E2F

La mayoría de cascadas de señalización se inician tras la activación de receptores de factores de crecimiento, convergiendo en la activación de los reguladores del ciclo celular, principalmente en la vía ciclina-CDK-pRB-E2F (L. Fajas et al., 2010), que conduce hacia la progresión del ciclo celular y la división, pero también está implicada en la respuesta adaptativa del metabolismo inducida por los factores de crecimiento. En general, la proliferación requiere una fuerte demanda de glucosa para la biosíntesis de nuevas estructuras para las células. La glucosa no es sólo la principal fuente de energía, sino que también es la fuente de los equivalentes redox que normalmente se crean por la glucólisis anaeróbica y los procesos anabólicos tales como la biosíntesis de proteínas o de lípidos. Por esto, una de las principales funciones de la glicólisis es proveer intermediarios para la biosíntesis de macromoléculas que cubran los requerimientos indispensables para la proliferación, lo que sugiere que podría existir una conexión directa entre la regulación metabólica y la regulación de la progresión del ciclo celular. Existen indicios de que el eje ciclina-CDK-pRB-E2F ejerce efectos específicos en el metabolismo (Figura 2). Por ejemplo, se ha observado que ratones deficientes para alguno de los componentes de este eje tienen defectos metabólicos. Los ratones deficientes en CDK4 o E2F1 presentan grandes cambios metabólicos debidos a la alteración de la homeostasis de la glucosa y a que tienen comprometida la función mitocondrial (L. Fajas et al., 2010).

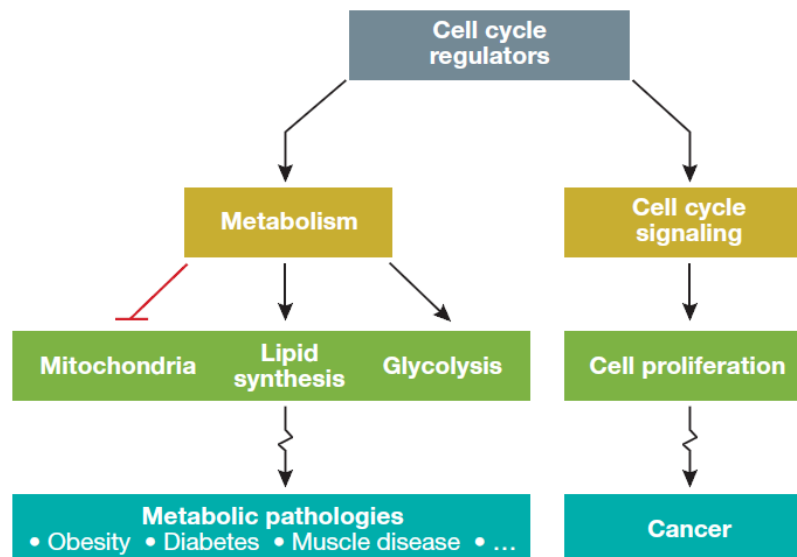


Figura 2. Ilustración de la doble función de la vía CDK4-pRB-E2F1 en la regulación del metabolismo y del ciclo celular. Bajo el estímulo adecuado, los reguladores del ciclo celular inducen la proliferación. Esto se acompaña de una respuesta metabólica adaptada que incluye la inhibición del metabolismo oxidativo, el aumento de glicólisis y la síntesis lipídica. Las células cancerígenas requieren estos cambios en su metabolismo. En condiciones particulares,

sin embargo, cuando las células no están preparadas para proliferar, los reguladores del ciclo son puramente reguladores metabólicos, por ejemplo, en respuesta al ayuno o a la inducción hormonal. La desregulación de este sistema puede desembocar en el desarrollo o progresión de patologías metabólicas, como la obesidad o diabetes.

3. PROHIBITINAS

Con el fin de buscar proteínas relacionadas con el metabolismo que interaccionaran con CDK4, en nuestro laboratorio se había llevado a cabo un estudio previo mediante la metodología del dos híbridos, en la que se utilizó como cebo la proteína CDK4 y como diana una genoteca de cDNA de hígado humano. Una de las proteínas candidatas obtenida fue una prohibitina, en concreto PHB2.

Las prohibitinas, PHB1 y PHB2 son proteínas muy conservadas en las células eucariotas, y están presentes en múltiples compartimentos celulares. Inicialmente se propuso PHB1 como inhibidor de la proliferación celular, de ahí su nombre prohibitina, aunque esta función inhibidora se atribuyó más tarde a la región 3'UTR del mRNA (Mishra et al., 2006). Sin embargo, ambas proteínas parecen tener un amplio rango de funciones, o al menos distintos estudios las han involucrado en aspectos diferentes de la fisiología celular.

PHB1 tiene una masa molecular de 30 kDa, mientras PHB2 posee una masa molecular teórica de 33 kDa y una aparente de unos 37 kDa. Ambas proteínas están altamente conservadas entre humanos y roedores, y muestran un alto nivel de conservación en otras especies.

Respecto a su localización celular, ambas han sido detectadas en la circulación humana (Mengwasser et al., 2004). También se han encontrado en la membrana plasmática de los linfocitos B en asociación con el receptor de IgM. Sin embargo, la mayoría de la proteína aparece localizada en el interior celular. Mediante inmunohistoquímica y fraccionamiento subcelular, en la mayoría de células y tejidos, han sido detectadas principalmente en la mitocondria (Nijtmans et al., 2000; Santamaria et al., 2003; Matsuyama et al., 1997; McClung et al., 1995). En la mitocondria, PHB1 y PHB2 parecen encontrarse en la membrana interna como un anillo de gran peso molecular constituido por múltiples subunidades de cada proteína (McClung et al., 1995). Muchos estudios apoyan una función de las prohibitinas como chaperonas para las proteínas recién importadas a las mitocondrias, protegiéndolas de la degradación por la proteasa mAAA, hasta que el resto de componentes de la cadena respiratoria mitocondrial son importados y ensamblados (Nijtmans et al., 2000). Las prohibitinas son esenciales para el desarrollo normal de las mitocondrias y el mantenimiento de la función mitocondrial (Nijtmans et al., 2000).

Por otro lado, se les ha encontrado localizadas en el núcleo (Kurtev et al., 2004; Sun et al., 2004; Wang et al., 2002; Montano et al., 1999), interaccionando con factores de transcripción importantes para la progresión del ciclo. Por ejemplo, en líneas celulares de cáncer de mama, PHB1 colocaliza en el núcleo con E2F1, proteína del retinoblastoma (pRB) y p53, pudiendo modular la actividad de éstas (Wang et al. 2002; Fusaro et al., 2003). PHB1 reprime la transcripción de E2F a través de diferentes mediadores moleculares, y facilita la canalización de rutas específicas de señalización (Wang et al., 1999).

OBJETIVOS

Los objetivos principales de este trabajo son:

- Demostrar la interacción física entre CDK4 y PHB2 en distintos tipos celulares de humano, de ratón y de rata.
- Estudiar el papel de ciclina D1 en la interacción entre CDK4 y PHB2.
- Estudiar la localización subcelular de CDK4 y PHB2 por fraccionamiento subcelular.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVOS

| Células | Estado | Origen |
|-------------------------------------|------------------|--|
| MEFs WT(wild type) | Inmortalizadas | fibroblastos embrionarios de ratón |
| MEFs KO (knock out) para ciclina D1 | Inmortalizadas | fibroblastos embrionarios de ratón |
| HEK 293T | Inmortalizadas | riñón embrionario humano |
| R3327-5'A | Inmortalizadas | cáncer de próstata de rata |
| MCF7 | Inmortalizadas | cáncer de mama humano |
| HDFa | Cultivo primario | fibroblastos dérmicos de humano adulto |

Tabla 1. Tipos celulares utilizados.

Se descongelaron las células en un baño a 37°C, a la vez que el medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de suero FBS (fetal bovine serum) y antibióticos (penicilina/ estreptomina, P/S). Se pasaron las células a un tubo de 12 ml y se añadieron 10 ml del medio para centrifugarlo a 1000 rpm, 5 minutos. A continuación, se aspiró el medio y se resuspendió el pellet en 1 ml de DMEM suplementado. Las células se plantaron en una placa de petri de 100 mm con 10 ml de medio DMEM suplementado y se dejó en el incubador a 37°C, con una atmósfera al 5% de CO₂. Estos pasos se hicieron con el fin de eliminar el DMSO (dimetil sulfóxido) que se utiliza para congelar las células.

Con el objetivo de mantenerlas, se deben pasar las células a nuevas placas cada tres días aproximadamente, observando que la confluencia se encuentre alrededor del 80%. Esto facilita la accesibilidad de nutrientes a todas las células, permite un crecimiento homogéneo y da la posibilidad de aumentar la cantidad células. Primeramente se aspiró el medio y se lavó con PBS 1X, tampón fosfato salino, a 37°C, con el fin de eliminar el suero. Se añadieron 2 ml de tripsina al 5%, a 37°C, la cual desestabiliza las uniones célula-placa y permite que se desenganchen. Se dejó actuar entre 2 y 5 minutos en el incubador a 37°C y seguidamente se añadieron 8 ml de medio DMEM suplementado para inactivar la acción de la tripsina. El contenido de la placa fue transferido a un tubo de 12 ml que se centrifugó 5 minutos a 10000 rpm. Luego se aspiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 ml del mismo medio. Por último, se plantaron en

placas de 100 mm con 10 ml de medio y se dejaron en el incubador con atmosfera húmeda, 5% de CO₂ y a 37°C.

Todas las células utilizadas necesitan el medio DMEM suplementado con suero y P/S para crecer, excepto la línea celular HDFa, que requiere que el medio DMEM esté suplementado con LSGS (low serum growth supplement) y P/S.

2. TRANSFECCIÓN

Se realizó la transfección con Polietilenimina (PEI) en placas al 70% de confluencia. Las cantidades de vector, optimem y PEI que se necesita para transfectar una placa de 100 mm son las siguientes: 24 µg de vector + 1.5 ml de optimem; 240 µl de PEI + 1.3 ml de optimem.

Se incubaron los vectores necesarios con el optimem en un eppendorf, y el PEI con el optimem en otro eppendorf, a temperatura ambiente (RT, room temperature), 5 minutos. Después se juntaron los vectores con el PEI, y se dejó incubando a RT, 10 minutos. Se lavaron las placas de las células con 3 ml de optimem y se añadió la mezcla de vectores + PEI. A continuación se dejó en el incubador a 37°C durante 1h. Transcurrido este tiempo, se retiró la solución de transfección, se añadió el medio DMEM (suero+P/S) y se colocó en el incubador unas 24 h, hasta que las células expresaran el contenido de los vectores transfectados.

Los vectores utilizados fueron: pCDK4, *Mus musculus* CDK4 en pSPORT6 (promotor CMV); pPHB2, *Homo sapiens* PHB2 en pSPORT6 (promotor CMV).

3. INMUNOPRECIPITACIÓN CON PARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Se comenzó recogiendo las células necesarias, normalmente una o dos placas de 100 mm, con PBS 1X frío y con ayuda de una rasqueta. Esta forma mecánica evita que otras sustancias químicas puedan interferir en los resultados. Se guardó el pellet a -80°C hasta su uso.

Primeramente se resuspendieron las células en 1 ml de tampón de lisis (LB, lysis buffer) (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 300 mM Sucrose, 0.05% NP-40, 1 mM DDT, 1x PIA, 0.5x PPI, 1x PIB, 1 mM PMSF, mQ water) y fueron pasadas a un homogenizador celular en hielo, donde se frotaron unas 45 veces para que se rompieran las células y que penetrara el LB. Se dejaron dos horas girando a 4°C y después se centrifugaron 5 minutos a 4°C, 2000 rpm. El

sobrenadante se pasó a un eppendorf nuevo. El pellet resultante estaba compuesto por células que no se habían roto, membranas, orgánulos, y otros restos que no interesaban.

Preparación de las partículas magnéticas

Para el preclareado se cogieron 75 μ l de Dynabeads Protein G (Invitrogen) y para cada anticuerpo 50 μ l. Se lavaron dos veces con 800 μ l de 100 mM NaPhosphate pH 7.4 (Na_2PO_4 , NaPO_4 , H_2O) + 0.01% tween-20. Para la unión de los anticuerpos se añadieron entre 2-3 μ g de anticuerpo por placa de 100 mm, 10 μ l de R α -CDK4 0.2 μ g/ μ l y 2 μ l de R α -Flag 1 μ g/ μ l, ambos diluidos en 200 μ l de 100 mM NaPO_4 + 0.01% tween-20. Se dejó incubando a RT un mínimo de 15 minutos y después se hicieron dos lavados con 200 μ l de LB.

Para reducir el ruido de fondo y evitar resultados inespecíficos se hizo un preclareado, juntando el sobrenadante de la lisis celular con las partículas sin anticuerpo. Del sobrenadante se cogieron 30 μ l y se mezclaron con 30 μ l 2x SSR, dos minutos a 95°C, para que se desnaturalizara la muestra. De aquí se obtuvo la fracción del extracto total (INPUT).

Unión

El sobrenadante del preclareado se repartió entre las partículas con anticuerpos y se dejó incubando dos horas, rotando a 4°C. Después se retiró el sobrenadante, del que se tomó una alícuota de 40 μ l y se juntó con 40 μ l de 2x SSR, dos minutos a 95°C. De aquí se obtuvo la fracción no unida (NB, not bound).

Se lavaron las partículas tres veces con 400 μ l del LB, 5 minutos, 4°C. Para la elución se añadieron 40 μ l de 2x SSR y se dejó tres minutos a 95°C. Después se dio un pulso de centrifuga y se pasó el sobrenadante a un nuevo eppendorf. Esta fue la fracción inmunoprecipitada (IP).

4. WESTERN BLOT

Los geles fueron preparados a partir de una solución del 30% acrilamida y 2% bis-acrilamida. La polimerización se inicia al añadir TEMED, compuesto iniciador de la reacción, y el persulfato amónico, que es el catalizador. El gel empaquetador contiene acrilamida al 5% y un pH ligeramente ácido, en el que se cargan las muestras, se empaquetan y se encarga de que todas las proteínas de las muestras empiecen a correr a la vez. El gel separador está compuesto por un porcentaje variable, dependiendo del peso molecular de las proteínas que se quieran ver.

Éste tiene un pH básico y es donde las muestras corren electroforéticamente. La electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida se usa para separar las proteínas según su peso molecular en condiciones desnaturalizantes. El dodecilsulfato sódico (SDS) es un detergente aniónico que desnaturaliza las proteínas y les confiere una carga neta negativa. Al aplicar al gel un campo eléctrico constante de 20 mA dentro de una solución tampón electrolítica, las proteínas corren a través de una matriz porosa de poliácridamida desde el polo negativo al polo positivo, con mayor o menor velocidad dependiendo de su peso molecular.

Transferencia de las proteínas a la membrana

Para la transferencia primero se hidrató la membrana de PVDF (polifluoruro de vinilideno) con metanol para activarla, y se lavó varias veces con agua destilada, para dejarla después en tampón de transferencia. Para transferir las proteínas se utilizó el sistema semidry, y se aplicó un campo eléctrico constante de 60 mA por cada gel. Las proteínas se desplazaban hacia el polo positivo, quedando retenidas en la membrana. A continuación se bloqueó la membrana con una solución de leche desnatada al 5% en tampón TBST (tris-buffered saline + tween-20) (20 mM Tris, 0.125 M NaCl, 0.1% tween-20), 30 minutos a RT, para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos. Esta solución se utilizó para todos los anticuerpos, excepto para α -VDAC, que requiere que la membrana se incube con una solución de BSA (bovine serum albumin) al 3%.

Anticuerpo primario

Seguidamente se lavó la membrana tres veces con TBST a RT, un lavado de 15 minutos y otros dos de cinco. Se incubó con el anticuerpo primario diluido en una solución de TBST con 0.25% de leche desnatada (0.3% BSA para el anticuerpo α -VDAC). Habitualmente se dejaba incubar durante toda la noche a 4°C. En algunos casos se puede incubar por un mínimo de 2 horas a RT. Dependiendo de la dilución de anticuerpo, se utilizó una cantidad u otra: si la dilución es $1/\geq 1000$, se utilizaban 4 ml de la solución de anticuerpo en un falcon de 50 ml en un rotor; si la dilución del anticuerpo es $1/\leq 1000$, se usaba 1 ml de la solución del anticuerpo en una caja sin agitación.

Los anticuerpos utilizados para los Western Blot fueron (Tabla 2):

| Antígeno | Hospedador | Dilución para WB | Tamaño de la proteína a detectar |
|--------------|------------|------------------|--|
| CDK4 | Rabbit | 1/250 | 34 kDa |
| Complex II | Mouse | 1/4000 | 70 kDa |
| Sec6 | Mouse | 1/250 | 87 kDa |
| Lamin A/C | Mouse | 1/2000 | 62/69 kDa |
| Tubulina | Mouse IgM | 1/2000 | 55 kDa |
| VDAC | Rabbit | 1/1000 | 36 kDa |
| PCNA | Mouse | 1/1000 | 30 kDa |
| CycD1 (DCS6) | Mouse | 1/250 | 36 kDa |
| PHB2 | Rabbit | 1/250 | 33 kDa (teórica) 37 kDa (observada) |

Tabla 2. Listado de los anticuerpos utilizados.

Anticuerpo secundario

Antes de incubar con el anticuerpo secundario se lavó la membrana con TBST, una vez de 15 minutos y otra de 5 a RT. Se hizo un tercer lavado de 10 minutos con la disolución de 0.25% de leche desnatada en TBST. A continuación se incubó con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con una peroxidasa (Amersham). Rutinariamente se utiliza una dilución 1/12500 en la solución de TBST con 0.25% de leche desnatada. En todos los casos se utilizó un falcon de 50 ml con 25 ml de la solución con el anticuerpo y se dejaba un mínimo de media hora a RT. Después se realizaban tres lavados de 10 minutos con TBST a RT. Para la detección se usó el sustrato quimioluminiscente Immobilon (Millipore), incubando la membrana con ello cinco minutos. Finalmente se detectaban las proteínas en el ChemiDoc (BioRad).

5. FRACCIONAMIENTO CELULAR PARA AISLAR LAS MITOCONDRIAS

Es aconsejable comenzar el protocolo con un mínimo de cinco placas de células de 15 cm. Primero se retiró el medio y se lavaron las placas con PBS a RT. Para recogerlas se utilizó PBS frío y una rasqueta. Se siguió el protocolo de fraccionamiento descrito en Wieckowski et al. 2009. Se juntaron las células en un falcon de 50 ml y se centrifugó a 4°C hasta obtener el pellet, 10 minutos a 800 g y otros 5 minutos a 3000 rpm. Se retiró el sobrenadante, el pellet se resuspendió en el tampón 1 en frío (225 mM manitol, 75mM sucrose, 0.1 mM EGTA, 30 mM Tris-HCl pH 7.4),

y se pasó por el homogenizador un mínimo de 45 veces. A continuación se transfirió todo a un tubo de 15 ml que se centrifugó a 600 g y 4°C, 5 minutos. Se tomó una alícuota del pellet (restos celulares + núcleo) y se guardó a -80°C como fracción N-RC.

El sobrenadante se centrifugó 5 minutos a 600 g y 4°C, y el sobrenadante obtenido de esa centrifugación se pasó a tubos de 1.5 ml (4-5 tubos), para centrifugarlos 10 minutos a 7000 g y 4°C. Se pasaron los sobrenadantes a un tubo ultra-Clean de 5 ml y el pellet resultante se mantuvo en hielo hasta más adelante, ya que es la fracción de las mitocondrias. El tubo de 5 ml se centrifugó a 20000 g, 30 minutos a 4°C, y el sobrenadante resultante se pasó a un tubo ultra-Clean de 5 ml. El pellet (fracción de membranas plasmáticas y lisosomas) se guardó a -80°C como fracción L-MP. El sobrenadante se centrifugó una hora a 100000 g, 4°C. El sobrenadante obtenido de esta centrifugación se pasó a un tubo de 1.5 ml y se guardó como fracción Cito (citoplasma) a -80°C. El pellet resultante también se guardó a -80°C como fracción RE (retículo endoplasmático).

La fracción mitocondrial reservada se resuspendió suavemente en 1 ml del tampón 2 (225 mM manitol, 75 mM sucrose, 30 mM Tris-HCl pH 7.4) y se centrifugó 10 minutos a 7000 g y 4°C. El sobrenadante se desechó y el pellet se resuspendió igual que antes. Esto se centrifugó de nuevo a 10000 g otros 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió suavemente en 0.5 ml del tampón 3 (250 mM manitol, 5 mM Hepes pH 7.4, 0.5 mM EGTA). Se tomó una alícuota que fue guardada a -80°C como fracción C-Mito (crudo de mitocondrias).

Para la siguiente centrifugación hubo que preparar un gradiente de densidad con 4 ml del buffer Percoll (225 mM manitol, 25 mM Hepes pH 7.4, 1 mM EGTA, 30% v/v Percoll), en un tubo ultra-Clear de 5 ml. Sobre ello se echó la suspensión de mitocondrias, se cubrió con tampón 3 y se centrifugó a 95000 g, 30 minutos a 4°C en un rotor basculante. Tras la centrifugación, se obtuvo un aspecto como el que se observa en la imagen (Figura 3). Se extrajo la fracción MAM (superior) con una aguja y se pasó a un tubo de 1.5 ml. Lo mismo se hizo con la fracción de mitocondrias puras (Mito) de la base. Tras diluir las fracciones diez veces con el tampón 3, se volvió a centrifugar 10 minutos a 6300 g y 4°C. El sobrenadante de MAM se pasó a tubos ultra-Clean de 0.8 ml que se volvieron a centrifugar una hora a 100000 g, 4°C. El pellet obtenido se guardó a -80°C como fracción MAM (membranas asociadas a mitocondrias).

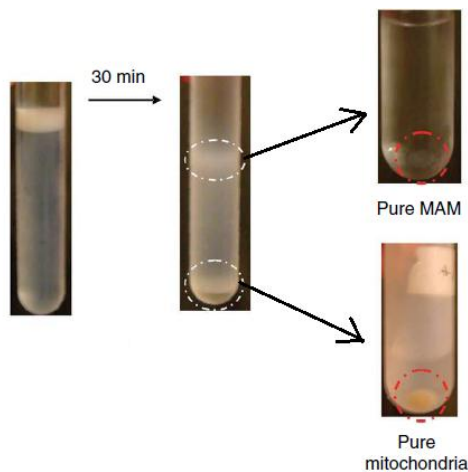


Figura 3. Resultado de la centrifugación de la fracción mitocondrial en el gradiente de densidad.

Por último, el pellet Mito se resuspendió suavemente en 1 ml del tampón 3 y se centrifugó 10 minutos a 6300 g, 4°C. El pellet resultante se guardó a -80°C como fracción Mito (mitocondrias puras).

6. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS Y CUANTIFICACIÓN

Para realizar la cuantificación de proteínas de las muestras, se utilizó el método colorimétrico, DC Protein assay (BioRad).

Se comenzó tomando las distintas fracciones obtenidas del protocolo de fraccionamiento celular y se unificaron los tampones en los que se encontraban. A cada muestra se añadió SDS al 1%, detergente que desestabiliza las membranas para que salgan las proteínas de las muestras al medio. Para realizar la recta patrón se utilizaron cinco soluciones de BSA de concentraciones crecientes desde 0.2 µg/µl hasta 1.5 µg/µl. A continuación se colocó cada muestra en un pocillo de una placa de 96 pocillos: 5 µl de muestra + 25 µl reactivo A' (A+S) + 200 µl reactivo B. Se dejó 15 minutos para que se diera la reacción colorimétrica y, por último, se colocó en el espectrofotómetro, para que se leyera la absorbancia de cada pocillo.

RESULTADOS

1. INTERACCIÓN ENTRE CDK4 Y PHB2

Con el objetivo de comprobar in vivo la interacción del dos híbridos entre CDK4 y PHB2, en nuestro laboratorio previamente se habían llevado a cabo experimentos de co-inmunoprecipitación (co-IP) de PHB2 con un anticuerpo específico contra CDK4 en células humanas HEK 293T, en condiciones tanto endógenas como de sobreexpresión. Estos experimentos arrojaron resultados positivos, quedando demostrado que la interacción CDK4-PHB2 también tenía lugar in vivo. Sin embargo, dado que las células HEK 293T poseen un cariotipo bastante complejo y no son un buen modelo ni para las células normales ni para las líneas tumorales, uno de los objetivos de este trabajo consistió en estudiar dicha interacción en otras líneas celulares de mayor relevancia biológica. A tal efecto, llevamos a cabo un experimento de co-IP en la línea celular R2337-5'A de cáncer de próstata de rata. Utilizamos un anticuerpo policlonal anti-CDK4 en la IP y como control de especificidad otro anticuerpo policlonal contra el epítipo Flag. Aunque el anticuerpo anti-CDK4 inmunoprecipitó de forma eficaz y específica la proteína, bajo las condiciones ensayadas no se observó co-IP de la proteína PHB2 (Figura 4).

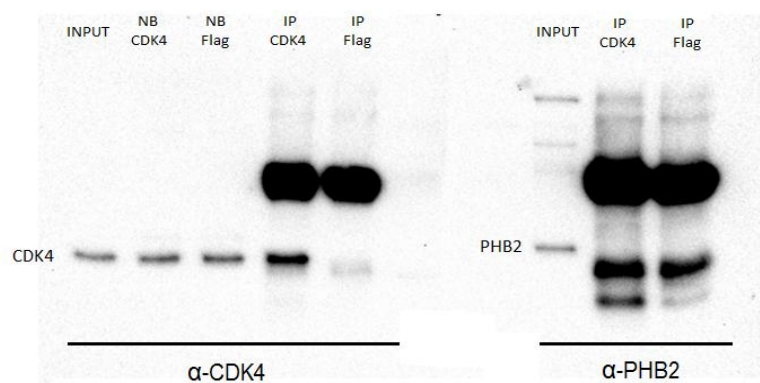


Figura 4. IP de la proteína endógena CDK4 en células de rata R2337-5'A. Inmunodetección de CDK4 (izquierda) y PHB2 (derecha). INPUT: extracto total clarificado; NB: fracción no unida al anticuerpo en la IP indicada; IP: inmunoprecipitación. Un anticuerpo anti-Flag se utilizó como control de especificidad. Las bandas más intensas en ambas membranas corresponden a la cadena pesada del anticuerpo usado en la IP.

Dado que la interacción entre ambas proteínas se había detectado previamente en células humanas, cabía la posibilidad de que tal interacción no tuviera lugar en las células de rata ensayadas. Por ello, probamos una IP usando el mismo protocolo en fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) immortalizados. El resultado obtenido, sin embargo, fue similar al descrito para las células R2337-5'A (Figura 5). En conjunto, estos resultados sugieren que el problema podría residir en las condiciones en las que se realiza la IP, quizá la fuerza iónica y/o la cantidad de

detergente no sean las apropiadas. No obstante, no se puede descartar que la interacción entre CDK4 y PHB2 ocurra exclusivamente en células humanas.

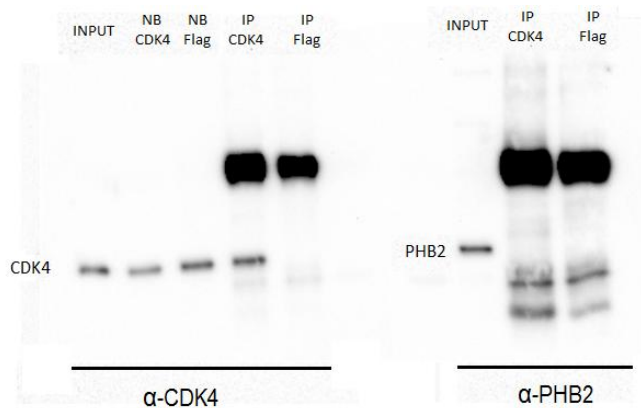


Figura 5. IP de la proteína endógena CDK4 en MEFs inmortalizados. Leyendas como en la Figura 4.

Para descartar posibles efectos del modelo, intentamos reproducir la interacción observada previamente en células 293T por sobreexpresión. Para tal fin, transfectamos las células con los vectores pCDK4 y pPHB2, y repetimos la IP con el mismo protocolo. En esta ocasión sí obtuvimos co-IP específica de PHB2 (Figura 6), aunque la cantidad de PHB2 obtenida en comparación con experimentos anteriores fue considerablemente menor (datos no mostrados). Esto hacía pensar que el protocolo realmente difería del utilizado previamente en nuestro laboratorio.

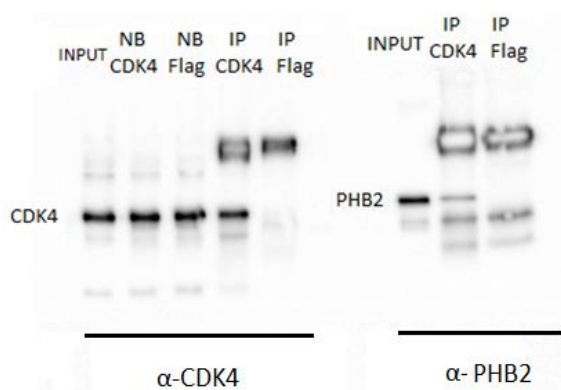


Figura 6. IP de la proteína CDK4 sobreexpresada en células humanas HEK 293T. Leyendas como en la Figura 4.

Para abordar esta posibilidad, revisamos detenidamente las condiciones de los protocolos de IP que se habían estado utilizando en el laboratorio. El detergente que se utilizaba en el tampón de lisis era distinto al empleado durante los lavados de la IP. Descubrimos una ambigüedad en nuestros protocolos, ya que no estaba claro si en los lavados se añadía el nuevo detergente al

tampón de lisis previo o si se sustituía completamente el detergente de la lisis por el de los lavados. Lo primero era lo que se había seguido hasta el momento en este trabajo, por lo que probamos como alternativa a utilizar Nonidet P-40 (0.05%) para la lisis y tween-20 (0.01%) en los lavados.

Con este protocolo, realizamos una IP en una línea celular de cáncer de mama humano (MCF7). Tras introducir esta variación en el tampón de lavado, obtuvimos una clara co-IP específica de PHB2 (Figura 7).

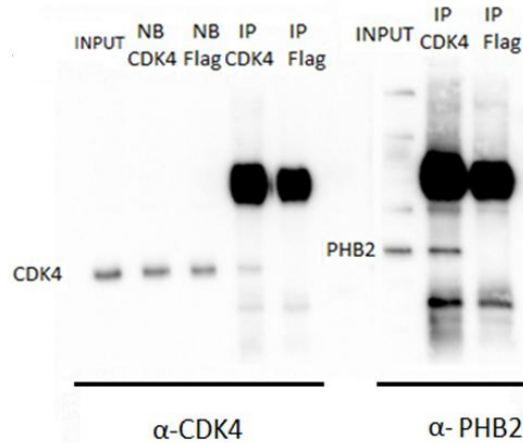


Figura 7. IP de la proteína endógena CDK4 en células humanas MCF7. Leyendas como en la Figura 4.

Una vez demostrada la interacción endógena entre CDK4 y PHB2 en células humanas con el protocolo optimizado, volvimos a investigar dicha interacción en los MEFs inmortalizados. Este tipo celular es de particular relevancia para nosotros porque nos permitirá evaluar el papel de CycD1 en la interacción CDK4-PHB2, ya que en nuestro laboratorio poseemos una línea celular de MEFs KO para CycD1. Al llevar a cabo la IP de CDK4 con el protocolo optimizado en MEFs WT inmortalizados también pudimos observar co-IP específica de PHB2 (Figura 8). Esto demuestra que la interacción CDK4-PHB2 no es exclusiva de las líneas humanas, y valida el uso del modelo murino en nuestro estudio.

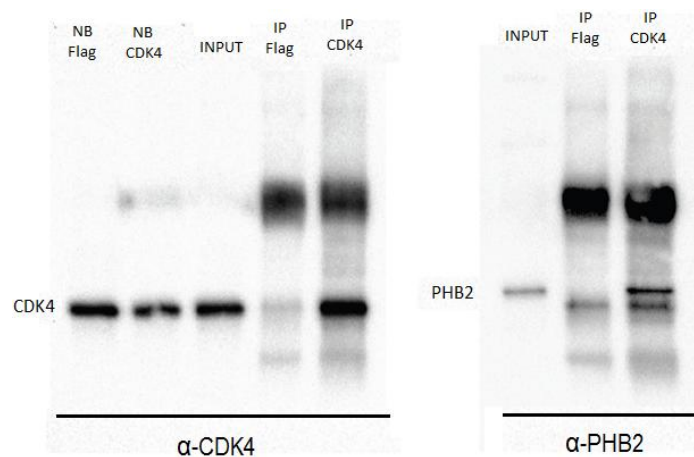


Figura 8. IP de la proteína endógena CDK4 en MEFs inmortalizados. Leyendas como en la Figura 4.

¿Es necesaria CycD1 para la interacción de CDK4 con PHB2?

Nuestro siguiente objetivo fue analizar si la formación del complejo CycD1-CDK4 es necesaria para la interacción entre CDK4 y PHB2, ya que se sabe que son las ciclinas las encargadas de activar a CDK4. Para ello se realizó una IP de CDK4 en MEFs inmortalizados, en la que preparamos tres tipos de extractos: MEFs WT, MEFs KO para CycD1 y una mezcla de ambos. Este último también se utilizó en una IP control con el anticuerpo policlonal anti-Flag. En este experimento pudimos observar co-IP de PHB2 independientemente de la presencia o no de CycD1 (Figura 9), lo que demuestra que la formación del complejo CycD1-CDK4 no es necesaria para la interacción entre CDK4 y PHB2. De hecho, se pudo observar mayor eficiencia de co-IP en las células KO para CycD1. Este resultado no parece deberse a un incremento en la eficiencia de la IP de CDK4, sugiriendo que en ausencia de CycD1, PHB2 podría interactuar más fuertemente con CDK4. No obstante, este resultado es muy preliminar y precisa ser corroborado con más experimentos.

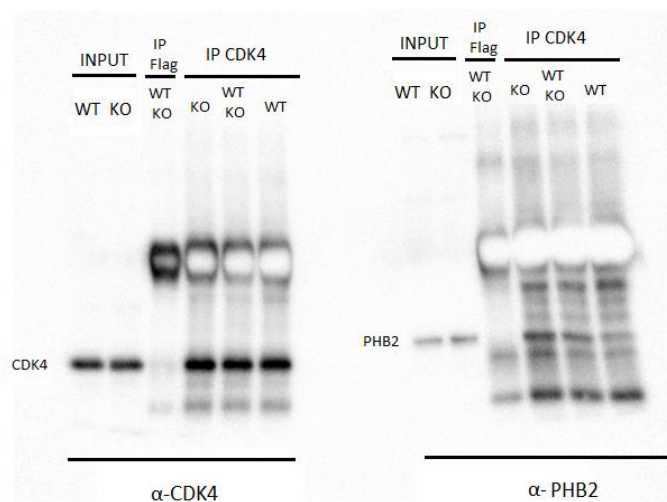


Figura 9. IP de la proteína endógena CDK4 en MEFs WT y KO para CycD1. Leyendas como en la Figura 4.

Dado que las IPs llevadas a cabo en los MEFs KO para CycD1 sugieren la posibilidad de una unión competitiva por CDK4 entre CycD1 y PHB2, evaluamos seguidamente si podíamos detectar complejos que contuviesen ambas proteínas al mismo tiempo. Para ello inmunoprecipitamos CycD1 con un anticuerpo específico e intentamos detectar co-IP de PHB2. En estos experimentos utilizamos los MEFs KO para CycD1 como control de especificidad de la IP. Aunque en los MEFs WT obtuvimos una buena eficiencia de IP de CycD1 y detectamos co-IP

específica de CDK4, en ningún caso obtuvimos co-IP de PHB2 (Figura 10). Estos experimentos fueron repetidos dos veces. Este resultado refuerza la idea de que CycD1 y PHB2 no parecen interactuar entre ellas y podrían estar compitiendo por su unión a CDK4.

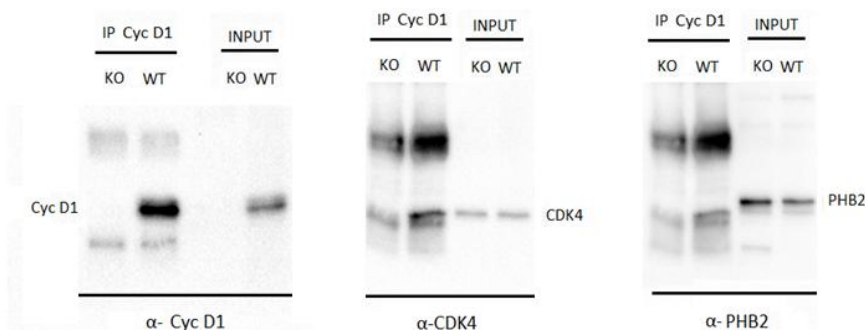


Figura 10. IP de la proteína endógena CycD1 en MEFs WT y KO para CycD1. Leyendas como en Figura 4.

2. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS PROTEÍNAS DE INTERÉS

Dado que una de las funciones mejor estudiadas de PHB2 es su papel en la fisiología mitocondrial, intentamos llevar a cabo estudios de localización celular de CDK4, CycD1 y PHB2 mediante fraccionamiento celular, siguiendo el protocolo descrito previamente por Pinton y colaboradores (Wieckowski et al., 2009). Este protocolo está optimizado para conseguir fracciones puras de mitocondrias. Haciendo uso de dicho protocolo, analizamos tanto líneas celulares (MEFs WT y KO para CycD1) como extractos crudos de hígado de ratón, ya que el dos híbridos donde se describió la interacción entre CDK4 y PHB2 se había llevado a cabo con una genoteca de cDNA de hígado humano.

Aunque el protocolo empleado genera una serie de fracciones enriquecidas en distintos orgánulos y componentes celulares, el uso de marcadores moleculares específicos de las distintas fracciones pone de relieve la existencia de contaminación cruzada entre éstas. Por ejemplo, PCNA como marcador nuclear soluble aparece casi exclusivamente en la fracción citosólica (Figura 11), mientras la lamina A/C como marcador nuclear estructural aparece en la fracción nuclear (datos no mostrados). Esto sugiere que el procedimiento de lisis celular empleado es demasiado drástico y compromete en gran medida la integridad de los núcleos. Igualmente, la porina mitocondrial VDAC también aparece en las fracciones del retículo endoplasmático (RE) y de los lisosomas y membrana plasmática (L-MP) (Figura 11). Esto también podría deberse a la rotura de una fracción significativa de las mitocondrias durante la lisis celular.



Figura 11. Fraccionamiento celular de MEFs WT. En cada calle se cargó la misma cantidad de proteína total. Mito: mitocondrias puras; Cito: citoplasma; RE: retículo endoplasmático; L-MP: lisosomas y membrana plasmática; N-RC: núcleo y restos celulares.

A pesar de estos problemas técnicos para preservar la integridad nuclear y/o mitocondrial, así como la contaminación cruzada entre fracciones, los marcadores no mitocondriales sí que parecen estar ausentes de la fracción mitocondrial. Esto seguramente responde al hecho de que esta fracción es la única purificada en un gradiente de densidad y no únicamente por centrifugación diferencial como el resto de fracciones. Por tanto, la comparación entre la fracción mitocondrial y citosólica aún es útil para evaluar la localización de nuestras proteínas de interés.

En MEFs WT inmortalizados CDK4 apareció en todas las fracciones aisladas, incluyendo la fracción mitocondrial purificada en el gradiente de densidad (Figura 11). Aunque la aparición de CDK4 en el citosol podría explicarse al menos en parte por contaminación nuclear (PCNA y CycD1 aparecen casi exclusivamente en el citosol), la abundancia de CDK4 en el RE y la fracción L-MP no podría explicarse de la misma manera. En todo caso, y teniendo en cuenta la aparición de marcadores mitocondriales en estas fracciones (ver cII, VDAC en la Figura 11), podría tratarse más bien de una contaminación del RE y L-MP con mitocondrias o fragmentos de éstas. La ausencia de contaminación del citosol con dichos marcadores puede explicarse por la asociación de estas proteínas a la membrana mitocondrial. Igualmente, CDK4 podría en parte encontrarse en otras estructuras vesiculares de la célula, ya que Sec6, un marcador de vesículas, también se distribuye principalmente en las fracciones RE y L-MP.

Lo que queda claro es que tanto CDK4 como PHB2 se localizan en la mitocondria. Esta localización no puede explicarse por contaminación entre fracciones, ya que ni PCNA, CycD1, tubulina, Sec6 (Figura 11) ni lamina A/C (datos no mostrados) aparecen en la fracción

mitocondrial. Por tanto, los resultados del fraccionamiento de MEFs WT refuerzan una vez más la idea de que la interacción entre CDK4 y CycD1 o PHB2 podrían ser mutuamente excluyentes.

Por otra parte, el fraccionamiento de MEFs KO para CycD1 arrojó resultados totalmente comparables a los obtenidos en los MEFs WT (datos no mostrados). Como cabría esperar, al menos respecto a la localización mitocondrial, la ausencia de CycD1 no afectó de forma aparente a la distribución de CDK4 en las distintas fracciones celulares.

Finalmente, estudiamos la localización de CDK4 en las fracciones celulares obtenidas a partir de extractos crudos de hígado de ratón. Sorprendentemente, en estos experimentos que fueron repetidos por triplicado, nunca pudimos detectar CDK4 en la fracción mitocondrial (Figura 12).

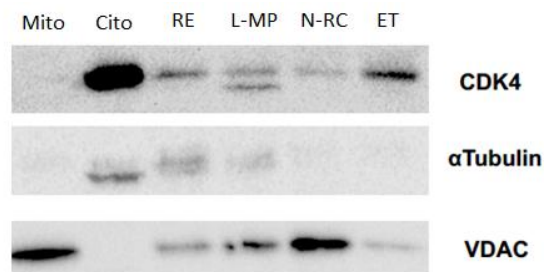


Figura 12. Fraccionamiento celular a partir de hígado de ratón. Mito: mitocondrias puras; Cito: citoplasma; RE: retículo endoplasmático; L-MP: lisosomas y membrana plasmática; N-RC: núcleo y restos celulares; ET: extracto total de células.

DISCUSIÓN

En este trabajo hemos demostrado la interacción entre la quinasa dependiente de ciclina CDK4 y la proteína prohibitina 2 en distintos tipos celulares de relevancia biológica. Aunque dicha interacción había sido demostrada con anterioridad en las células humanas HEK 293T in vivo, el complejo cariotipo de estas células que las inhabilita como modelo tanto de células normales como de células tumorales hacía imprescindible extender el estudio de dicha interacción a otros tipos celulares. Aquí hemos corroborado la interacción entre CDK4 y PHB2 mediante experimentos de co-inmunoprecipitación en condiciones endógenas de expresión en dos modelos celulares: una línea tumoral humana de cáncer de mama (MCF7) y en MEFs inmortalizados. El hecho de que la interacción observada sólo sea detectable cuando se utiliza unas condiciones de lavado poco estrictas (tween-20 0.01%) hace pensar que dicha interacción pueda ser considerablemente débil. Un aspecto que queda por determinar es si la interacción entre CDK4 y PHB2 es directa o está mediada por otras proteínas. En principio, el hecho de haberse detectado esta interacción en un ensayo de dos híbridos, un sistema heterólogo, apunta a que la interacción podría ser directa. No obstante, y dado el grado de conservación evolutivo entre algunas proteínas de la levadura y de los mamíferos, no podemos descartar que la interacción del dos híbridos no pudiera estar mediada por alguna proteína de *Saccharomyces cerevisiae*. Se necesitará purificar ambas proteínas en sistemas heterólogos y llevar a cabo ensayos in vitro para llegar a conclusiones firmes al respecto.

Utilizando MEFs inmortalizados KO para CycD1 hemos demostrado que CDK4 no requiere formar complejo con CycD1 para interactuar con PHB2. De hecho, nuestros experimentos apuntan más bien a lo contrario, a que CycD1 podría estar compitiendo con PHB2 por la unión a CDK4. Esto viene apoyado por el hecho de que PHB2 no se detecta en las IPs de CycD1. Parece que CDK4 podría estar interactuando con estas proteínas de manera mutuamente excluyente. No obstante, nuestros resultados a este respecto son muy preliminares y necesitarán más apoyo experimental para determinar dicho aspecto de forma concluyente. En cualquier caso, tal competencia por la unión a CDK4 puede estar mediada en gran parte por la localización subcelular de estas proteínas, tal y como sugieren los resultados de nuestros experimentos de fraccionamiento celular.

En este trabajo también hemos intentado abordar la localización subcelular de CDK4, PHB2 y CycD1. Aunque el protocolo utilizado está optimizado para la purificación de mitocondrias (Wieckowski et al., 2009), también debería permitir el aislamiento de otras fracciones

enriquecidas en distintos componentes celulares. Sin embargo, nuestros marcadores moleculares específicos indican que en nuestros experimentos ha habido una importante contaminación cruzada entre distintas fracciones. No obstante, la fracción mitocondrial parece haber estado exenta de tal contaminación, ya que las mitocondrias son purificadas en un paso final que incluye su separación en un gradiente de densidad y no simplemente por centrifugación diferencial como el resto de fracciones. En futuros experimentos se hace necesario modificar el procedimiento de rotura celular para conservar la integridad de los núcleos y otros componentes.

Tanto en MEFs WT como en KO para CycD1, al menos una subpoblación de PHB2 y CDK4 se encuentran en la mitocondria. Quizá sea en este contexto donde ambas proteínas interaccionan. Por el contrario, CycD1 no se detecta en la fracción mitocondrial, a pesar de mostrar una señal considerablemente intensa en el citosol. Esto refuerza nuestra hipótesis de que CycD1 y PHB2 no forman parte del mismo complejo con CDK4. Una incógnita que permanece es si la CDK4 que interacciona con PHB2 (presumiblemente localizada en la mitocondria) está o no asociada a alguna ciclina. Parece improbable que lo esté con CycD1, pero cabe la posibilidad de que lo estuviese con CycD2 o CycD3, o incluso con alguna ciclina de otro tipo. Aunque nosotros hemos intentado la detección de CycD3 en nuestros fraccionamientos, no conseguimos detectar ninguna señal, bien porque el anticuerpo no funcionó correctamente o por falta de expresión de la proteína.

En los fraccionamientos celulares llevados a cabo con extractos de hígado de ratón, no pudimos detectar CDK4 en la mitocondria. Esto es sorprendente porque la interacción entre ambas proteínas se describió en un ensayo de dos híbridos que usaba una genoteca de cDNA de hígado humano. Si la interacción entre PHB2 y CDK4 ocurre en la mitocondria, sería en principio previsible que ambas proteínas estuviesen localizadas en este orgánulo también en el hígado. Quizá el estado metabólico de las células tenga una influencia determinante sobre la localización subcelular de la proteína. Los ratones utilizados en estos experimentos fueron un regalo de otros grupos de investigación y las condiciones de crecimiento no pudieron ser controladas por nosotros. Por ejemplo, el protocolo de fraccionamiento recomienda someter al ratón a un periodo de ayuna previo al sacrificio. Esto no pudo llevarse a cabo en nuestro caso.

¿Qué papel puede desempeñar CDK4 en la función de PHB2? Una posibilidad obvia implicaría una función reguladora mediante fosforilación. Algunos estudios han mostrado una interacción entre PHB2 y proteínas nucleares implicadas en el ciclo celular, tales como pRB o E2F (Wang et al., 2002; Fusaro et al., 2003). Quizá la fosforilación de PHB2 por CDK4 module su capacidad de

interacción con otras proteínas, lo cual podría ejercer un efecto en la regulación del ciclo celular. Por otro lado, atendiendo a la función esencial de PHB2 en la mitocondria que varios estudios demuestran (Nijtmans et al., 2000; Santamaria et al., 2003), y a la importancia de la presencia de CDK4 para que no se comprometa la función mitocondrial (Fajas et al., 2010), podríamos hipotetizar que esta función mitocondrial dependiente de CDK4 podría estar mediada a través de la regulación de PHB2. Sin duda serán necesarias futuras investigaciones en el laboratorio de ciclo celular para arrojar luz sobre la enigmática relación entre CDK4 y las prohibitinas.

CONCLUSIONES

Las conclusiones principales que se pueden extraer de este trabajo son:

- La proteína CDK4 interacciona con PHB2 a niveles endógenos en distintos modelos celulares.
- La interacción entre CDK4 y PHB2 no requiere CycD1.
- Ambas proteínas CDK4 y PHB2 se localizan en las mitocondrias. Por el contrario, CycD1 parece estar excluida de este orgánulo.
- CycD1 posiblemente no interacciona con PHB2 y compite con ésta por la unión a CDK4.

BIBLIOGRAFÍA

Berger KH, Yaffe MP.(1998) Prohibitin family members interact genetically with mitochondrial inheritance components in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 18: 4043–52.

Beroukhim, R., Mermel, C. H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J. S., Dobson, J., Urashima, M. et al. (2010). The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 463, 899-905.

Bockstaele, L., Coulonval, K., Kooken, H., Paternot, S., Roger, P. P. (2006). Regulation of CDK4. *Cell. Div.* 1, 25.

C. Merkwirth, T. Langer. (2009) Prohibitin function within mitochondria: Essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1793, 27–32.

C. Osman, C. Merkwirth, T. Langer. (2009) Prohibitins and the functional compartmentalization of mitochondrial membranes. *Journal of Cell Science* 122, 3823-3830.

E. Blanchet, J-S Annicotte, L. Fajas. (2009) Cell cycle regulators in the control of metabolism. *Cell Cycle.* 8(24): 4029–4031.

Fusaro G, Dasgupta P, Rastogi S, Joshi B, Chellappan S.(2003) Prohibitin induces the transcriptional activity of p53 and is exported from the nucleus upon apoptotic signaling. *J Biol Chem.* 278: 47853–61.

J-S. Annicotte, E. Blanchet, C. Chavey, I. Iankova, S. Costes, S. Assou, J. Teyssier, S. Dalle, C. Sardet, L. Fajas. (2009) The CDK4-pRB-E2F1 pathway controls insulin secretion. *Nat Cell Biol.* 11(8): 1017–1023.

Kato, J., Matsushime, H., Hiebert, S. W., Ewen, M. E. and Sherr, C. J. (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev.* 7, 331-342.

Kurtev V, Margueron R, Kroboth K, Ogris E, Cavailles V, Seiser C.(2004) Transcriptional regulation by the repressor of estrogen receptor activity via recruitment of histone deacetylases. *J Biol Chem.* 279: 24834–43.

L. Fajas. (2013) Re-thinking cell cycle regulators: the cross-talk with metabolism. *Frontiers in oncology*, volume 3.

- M. Artal-Sanz, N. Tavernarakis.** (2009) Prohibitin and mitochondrial biology. Trends in Endocrinology and Metabolism.
- M. Malumbres, M. Barbacid.** (2009) Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. Nature Reviews.
- M. Wieckowski, C. Giorgi, M. Lebiezinska, J. Duszynski & P. Pinton.** (2009) Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. Nature protocols.
- Matsushime, H., Quelle, D. E., Shurtleff, S. A., Shibuya, M., Sherr, C. J. and Kato, J. Y.** (1994). D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. Mol. Cell. Biol. 14, 2066-2076.
- Matsushime, H., Roussel, M. F., Ashmun, R. A. and Sherr, C. J.** (1991). Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. Cell 65, 701-713.
- Matsuyama S, Kubo K, Ohashi F, Takamori Y.** (1997) Partial cloning of prohibitin cDNA from canine, feline, bovine, equine, and rabbit liver mRNA by RT-PCR. J Vet Med Sci. 59: 201–3.
- McClung JK, Jupe ER, Liu XT, Dell’Orco RT.**(1995) Prohibitin: potential role in senescence, development, and tumor suppression. Exp Gerontol. 30: 99–124.
- Mengwasser J, Piau A, Schlag P, Sleeman JP.**(2004) Differential immunization identifies PHB1/PHB2 as blood-borne tumor antigens. Oncogene; 23: 7430–5.
- Montano MM, Ekena K, Delage-Mourroux R, Chang W, Martini P, Katzenellenbogen BS.** (1999) An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens. Proc Natl Acad Sci USA. 96: 6947–52.
- Nijtmans LG, Artal SM, Grivell LA, Coates PJ.**(2002) The mitochondrial PHB complex: roles in mitochondrial respiratory complex assembly, aging and degenerative disease. CMLS, Cell Mol Life Sci. 59: 143–55.
- Nijtmans LG, de Jong L, Artal Sanz M, Coates PJ, Berden JA, Back JW, Muijsers AO, van der Spek H, Grivell LA.**(2000) Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. EMBO J. 19: 2444–51.

S. Mishra, Leigh C. Murphy, Liam J. Murphy.(2006) The Prohibitins: emerging roles in diverse functions. *J. Cell. Mol. Med.* Vol 10, No 2, 353-363.

Santamaria E, Avila MA, Latasa MU, Rubio A, Martin-Duce A, Lu SC, Mato JM, Corrales FJ. (2003) Functional proteomics of nonalcoholic steatohepatitis: mitochondrial proteins as targets of S-adenosylmethionine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100: 3065–70.

Sherr, C. J. (1995). D-type cyclins. *Trends Biochem. Sci.* 20, 187-190.

Sherr, C. J. and Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501-1512.

Sievers C, Billig G, Gottschalk K, Rudel T. (2010) Prohibitins Are Required for Cancer Cell Proliferation and Adhesion. *PLoS ONE* 5.

Stacey J. Baker, E. Premkumar Reddy. (2012) CDK4: A Key Player in the Cell Cycle, Development, and Cancer. *Genes & Cancer* / vol 3 no 11-12.

Sun L, Liu L, Yang XJ, Wu Z.(2004) Akt binds prohibitin 2 and relieves its repression of MyoD and muscle differentiation. *117:* 3021–9.

Terashima M, Kim KM, Adachi T, Nielsen PJ, Reth M, Kohler G, Lamers MC.(1994) The IgM antigen receptor of B lymphocytes is associated with prohibitin and a prohibitin related protein. *EMBO J.*13: 3782–92.

V. Aguilar, L. Fajas. (2010) Cycling through metabolism. *EMBO Mol Med* 2, 338–348.

Wang S, Fusaro G, Padmanabhan J, Chellappan SP.(2002) Prohibitin co-localizes with Rb in the nucleus and recruits N-CoR and HDAC1 for transcriptional repression. *Oncogene*; 21: 8388–96.

Wang S, Zhang B, Faller DV.(1999) Rb and prohibitin target distinct regions of E2F1 for repression and respond to different upstream signals. *Mol Cell Biol.* 19: 7447–60.

X. Escoté, L. Fajas. (2014) Metabolic adaptation to cancer growth: From the cell to the organism. *Cancer Lett.*

Xiong, Y., Connolly, T. and Beach, D. (1991). Human D-type cyclin. *Cell* 65, 691-699.