

Tesis Doctoral

Participación de p19INK4d en la inducción de senescencia genotóxica y replicativa

Sonzogni, Silvina Verónica

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Sonzogni, Silvina Verónica. (2012). Participación de p19INK4d en la inducción de senescencia genotóxica y replicativa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Sonzogni, Silvina Verónica. "Participación de p19INK4d en la inducción de senescencia genotóxica y replicativa". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Participación de p19INK4d en la inducción de senescencia genotóxica y replicativa

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Silvina Verónica Sonzogni

Director de Tesis: Eduardo Tomás Cánepa

Consejero de Estudios: Eduardo Tomás Cánepa

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Química Biológica, FCEyN-UBA

Buenos Aires, Marzo 2012

Resumen

“Participación de p19INK4d en la inducción de senescencia genotóxica y replicativa”

A lo largo de la evolución, los organismos con tejidos renovables han desarrollado mecanismos para prevenir la tumorigénesis. Entre ellos, podemos mencionar a la senescencia celular y a la apoptosis. La senescencia se caracteriza por el arresto permanente del ciclo celular en respuesta a insultos tanto endógenos como exógenos. En los últimos años se han estudiado las moléculas involucradas en la activación de este mecanismo, destacándose la participación de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CKIs) p21Cip1, p16INK4a y p15INK4b.

En nuestro laboratorio se ha demostrado que la proteína p19INK4d (p19), un miembro de la familia INK4 de CKIs, se induce significativamente en respuesta a diversos genotóxicos aumentando la eficiencia de la reparación del ADN. El daño al ADN es un agente causal común de la respuesta senescente, independientemente del estímulo que le da origen. Los efectos provocados por diferentes inductores, tales como las especies reactivas de oxígeno (considerablemente aumentadas a lo largo del envejecimiento), los agentes genotóxicos (frecuentemente empleados en quimioterapia) o la activación de oncogenes, culminan dañando al ADN y activando en consecuencia mecanismos de arresto del ciclo celular.

El arresto es dependiente de factores que controlan la progresión del ciclo tales como p53 y pRb-p16. Si bien estos son los principales efectores moleculares involucrados en la iniciación y mantenimiento del estado de senescencia, las proteínas que participan en los mecanismos que sostienen la irreversibilidad del arresto del ciclo no han sido aún identificadas. La proteína p19 desempeña un papel importante en la respuesta celular frente al daño al DNA, además de ser un inhibidor del ciclo celular en la fase G1. Estas propiedades la convierten en un factor con potencial para participar en la iniciación y/o mantenimiento del estado de senescencia.

El objetivo general de este trabajo de investigación consiste en determinar la participación de p19 en la inducción y/o mantenimiento de la senescencia.

En este trabajo demostramos por primera vez que p19 induce su expresión en respuesta a distintos tipos de senescencia. Dicha inducción va acompañada de un arresto irreversible del ciclo y se correlaciona con la aparición de distintos marcadores de senescencia. Entre ellos, el aumento en la expresión p16INK4a y p21. La inducción de

estos dos genes se corresponde temporalmente con la de p19, lo que indica que p19 se induce tempranamente en respuesta a un estímulo que dispara la senescencia.

Demostramos que hay una relación directa entre la inducción de p19 y el establecimiento de la senescencia, dado que modulando los niveles de p19 se observó una alteración en el arresto del ciclo y en la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia. Se observó que la inducción de p19 esta regulada a nivel transcripcional. En senescencia genotóxica la inducción depende de E2F, sin embargo en senescencia fisiológica, pese a que hay un efecto inductor a nivel transcripcional, es independiente de este factor. La activación de p19 en senescencia está mediada por la vía de señalización relacionada a la respuesta general al daño, es decir la vía ATM/ATR--Chk1--p53. Por otro lado también se observó que p38 esta involucrada en la inducción de p19.

En respuesta a un estímulo senescente, p19 se transloca al núcleo y se une fuertemente a la cromatina, particularmente a la fracción correspondiente a la heterocromatina.

Cuando se analizaron los niveles de mRNA y proteína de p19 en diversos tejidos de ratones de distintas edades, se observó un aumento en los niveles de p19 directamente correlacionado a la edad de los ratones. Esto nos indica que la inducción de p19 no se limita solamente a los modelos de cultivos celulares utilizados, sino que también hay una correlación entre el aumento de expresión de p19 y el envejecimiento de un mamífero.

Descifrar los mecanismos involucrados en senescencia así como identificar las proteínas que participan tanto en su inducción como en su mantenimiento en respuesta a diferentes insultos, resulta un gran desafío para el desarrollo de estrategias para combatir el cáncer y enfermedades asociadas al envejecimiento.

Palabras claves: p19INK4d, ciclo celular, senescencia genotóxica, senescencia replicativa, heterocromatina, mantenimiento de la integridad genómica, ATM/ATR, E2F.

Abstract

“Role of p19INK4d in the induction of genotoxic-induced and replicative senescence”

During evolution, organisms with renewable tissues have developed mechanisms to prevent tumorigenesis, including cellular senescence and apoptosis. Cellular senescence is characterized by a permanent cell cycle arrest triggered by endogenous as well as exogenous stress. Over the years, studies on the molecules involved in the activation of this mechanism have highlighted the role of the cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs) p21Cip1, p16INK4a and p15INK4b.

In our laboratory, the p19INK4d protein, a member of the INK4 family of CKIs, has been shown to become significantly induced in response to various types of genotoxic stress and to stimulate DNA repair. DNA damage is a common trigger of cellular senescence, independently of the stimulus that originated it. As such, oxygen reactive species (significantly increased during aging), genotoxic drugs (frequently used in chemotherapy) or oncogene activation lead to DNA damage and consequently activate the cell cycle arrest machinery.

The arrest requires factors that regulate cell cycle progression such as p53 and pRb-p16. Although these are the main molecular effectors involved in the initiation and maintenance of the senescent state, the proteins responsible for the irreversibility of the cell cycle arrest remain yet to be identified. The p19 protein plays an important role in the cellular DNA damage response, in addition to being a G1-phase cell cycle inhibitor. These attributes point to p19 as a potential factor involved in the initiation and/or maintenance of the senescent state.

The aim of this thesis is therefore to examine the role of p19 in the induction and/or maintenance of cellular senescence.

The data presented here shows for the first time that p19 expression is upregulated by different types of senescence. This induction is associated with an irreversible cell cycle arrest and correlates with the appearance of multiple markers of cellular senescence, including an increase in p16INK4a and p21 expression. The up regulation of these two genes temporarily correlates with that of p19, suggesting that p19 is early induced following stimuli that trigger the senescence program.

Modulation of p19 levels affected cell cycle arrest and senescence-associated β -galactosidase activity, indicating a direct link between p19 induction and the establishment of cellular senescence. Although this induction occurs at the

transcriptional level for both genotoxic-induced and physiological (replicative) senescence, it is mediated by distinct mechanisms, requiring the E2F transcription factors only in the first context. p19 activation during senescence is mediated by the canonical DNA damage signaling pathway ATM/ATR--Chk1--p53. Finally, p38 is also shown to be involved in p19 induction.

Following a senescence-triggering stimulus, p19 translocates to the nucleus and tightly associates with chromatin, particularly the fraction corresponding to heterochromatin.

Analysis of p19 mRNA and protein levels in several tissues from differently aged mice revealed an up regulation of p19 that correlates with age. This indicates that p19 induction is not limited to the cell culture models used and that there is a correlation between p19 expression and the aging of a mammal.

To elucidate the mechanisms involved in senescence and to identify the proteins that mediate its induction as well as its maintenance constitute an important challenge for the development of therapeutic strategies aiming to overcome cancer and aging-associated diseases.

Keywords: p19INK4d, cell cycle, genotoxic senescence, replicative senescence, heterochromatin, maintenance of genome integrity, ATM/ATR, E2F.

Abreviaturas

ATM: *Ataxia-telangiectasia mutated*

ATR: *ATM and RAD3-related*

CAT: Cloranfenicol acetiltransferasa

CDKs: Quinasas dependientes de ciclinas

Chk1 y Chk2: *Checkpoint kinases 1 y 2*

Cip1: *CDK2 interacting protein 1*

CKIs: Proteínas inhibidoras de CDK

CPT: Camptotecina

DDR: Respuesta general al daño al ADN

DSBs: Daño de doble cadena

FL: *Full Length*

HEK293: Fibroblastos humanos de riñón

HP1: *Heterochromatin protein*

INK4: Inhibidores de CDK4

Kip1: *Kinase inhibiting protein 1*

MEFs: Fibroblastos embrionarios de ratón

PI3-K-like: Fosfatidilinositol-3 quinasa

R.O.S: Especies reactivas de oxígeno

SAHF: *Senescence-associated heterochromatin foci*

SAPKs: Quinasas activadas por estrés

SAPS: *Senescence-associated secretory phenotype*

SA-βgal: *Senescence Associated β-galactosidase*

SDFs: *Senescence-associated DNA damage foci*

UV: radiación ultravioleta

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

Agradecimientos

Antes que nada quiero agradecerle a Eduardo Cánepa (Edu), primero por haberme brindado la posibilidad de trabajar en su laboratorio, además por haberme dado su apoyo durante estos cinco años tanto en lo que se refiere a lo académico como en cosas de la vida... Por la paciencia y comprensión, por estar tan presente, por transmitirnos siempre su pasión por la ciencia, por las infinitas discusiones súper enriquecedoras, por el incentivo constante a seguir intentando cuando las cosas no salen como uno quiere. Por sus correcciones y críticas, por tener esa capacidad de hacer la pregunta que genera el vacío y te deja pensando por un rato ¿y ahora que le contesto? Gracias Edu por TODO.

A mis compañeros de laboratorio:

Primero el lado oeste,

A Juli por todo el apoyo brindado desde el primer día que llegue al labo, por los consejos y principalmente por su amistad.

A Marie por la infinidad de tramos compartidos escuchando Calamaro, por estar tan presente con su amistad, por haberme brindado su apoyo en momentos difíciles, por hacer que la cantidad de horas compartidas en el labo hayan sido y sean tan divertidas.

A Lau Bell por su gran compañerismo y amistad, por las tramos que la aturdo escuchando Ismael, por las charlas compartidas con los mates de la tarde y su buena onda.

Ahora el lado este,

A Flor por haberme ayudado desde el primer momento que llegue al labo, por su gran compañerismo, por el apoyo logístico cuando las cosas no salían, por su amistad y ni hablar de las tramos compartidas junto a Marie y Lau cantando y haciendo que las horas pasen mas rápido.

A Lu por su amistad y las infinitas charlas de fumadero, por tener siempre la respuesta correcta y ayudarme siempre que lo necesité, por su interés en todo y los consejos a la hora de planear un experimento.

A Dani por su ayuda, por su compañerismo e interés, por las charlas camino al facs y su buena onda.

A Niquet por ser tan pilas, por los mates, por los debates planteados en los almuerzos, por arreglar todo (si es necesario a los golpes) por su ayuda y buena onda siempre.

A Brunito por ser tan buen compañero, por su interés y participación en las discusiones, por las charlas compartidas camino a la facu y por haberme dado una mano siempre que lo necesité.

A los que ya no están en el labo, Marie Scassa, Willy, Gretel, Abelito, Pablo y Lau Byk por su apoyo y amistad desde el primer día, porque junto al resto de los integrantes del

labo hicieron que todo sea más fácil y divertido. Abelito como se extrañan las guerras con alcohol 70%. Lau Byk gracias por estar tan presente a pesar que ya no estas en el labo, aunque no quiera lo voy a tener que decir... la verdad que se los extraña mucho!

A los integrantes de los grupos de Moreno, Calvo, Kotler, Galiniana- Monte, Ruzal, Pecci, Vázquez, Guberman y Laderach los cuales colaboraron de alguna manera con el desarrollo de esta tesis.

A los integrantes del departamento de química biológica que me ayudaron.

A mis amigos y compañeros de la carrera Sabri, Diego, Julián, Fede, y Ruli por estar tan presentes y por su ayuda incondicional. También a Eva, Manu y Belén.

Sabri gracias por tu amistad, por tu apoyo en momentos difíciles, por todo lo que hiciste y haces por mi, por escucharme y ayudarme siempre.

A Sergio por brindarme todo su apoyo durante el tiempo compartido, por su paciencia y consejos alentadores siempre.

A la Universidad de Buenos Aires y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas por el apoyo económico brindado para el desarrollo de esta tesis.

A mi familia que a pesar de la distancia siempre estuvieron presentes.

A mis padres por su apoyo incondicional en cada una de mis decisiones, por estar tan presentes e interesarse por lo hago, sin ellos nada de esto hubiera sido posible, por su amor infinito y aliento en cada momento.

A mis hermanos Ana, Franco y Naty, por sus consejos, por la mano que siempre me dieron cada vez que los necesité, por sus palabras de aliento y por su compañía a pesar de la distancia.

A las luces de mis ojos que son mis sobrinos Jhoi, Costi, Giuli, Viki, Pancho y Mateo, por sus palabras de aliento cuando lo necesité, por ser los mejores sobrinos del mundo y brindarme su cariño siempre.

Índice

Índice	1
INTRODUCCIÓN.....	4
1. Senescencia Celular.....	5
2. Las dos caras de la senescencia	5
3. La senescencia celular en un contexto evolutivo.....	5
3.1 ¿La senescencia suprime o promueve el cáncer?	6
4. Características de la célula senescente	7
4.1 Arresto del ciclo	7
4.2 Cambios en el fenotipo celular	8
4.3 Actividad β -Galactosidasa positiva a pH=6	8
4.4 Cambios en la expresión génica	8
4.5 Formación de foci de heterocromatina (Senescence-associated heterochromatin foci SAHF)	9
4.6 Formación de foci asociados al daño al ADN (Senescence-associated DNA damage foci SDFs)	9
5. Causas de senescencia	10
5.1 Senescencia causada por el acortamiento de los telómeros.....	10
5.2 Senescencia causada por estrés oxidativo	11
5.3 Senescencia causada por estrés genotóxico.....	12
5.4 Senescencia inducida por activación oncogénica.....	12
6. Vías de señalización involucradas.....	13
7. Mantenimiento del estado de senescencia: Cambios en la estructura de la cromatina.....	14
8. Significado e importancia de la senescencia <i>in vivo</i>	16
8.1 Senescencia y cáncer	16
8.2 Senescencia y envejecimiento	16
8.3 Importancia de la inducción del mecanismo de senescencia.....	17
9. Rol de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclina (CKIs) en senescencia	18
9.1 Familia Cip/Kip	19
9.2 Familia INK4.....	19
9.3 p19 y su interacción con los mecanismos involucrados en el mantenimiento de la integridad genómica	21
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVO GENERAL	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
HIPÓTESIS	24
RESULTADOS.....	25
Modelos utilizados para senescencia por estrés genotóxico y senescencia fisiológica..	26
1. Caracterización de ambos modelos mediante el análisis de distintos marcadores de senescencia	26
1.1 Arresto del ciclo	26
1.2 Interrupción de la proliferación celular	28
1.3 Actividad β -galactosidasa positiva y cambios en la morfología celular	29
1.4 Formación de SAHF (senescence associated heterochromatin foci).....	31
2. Expresión de p19 en respuesta a senescencia.....	33
2.1 p19 se induce tempranamente en senescencia genotóxica	33
2.2 Inducción de p19 en senescencia replicativa.....	35
3. Diferencias en la activación de p19 según la dosis de genotóxico empleada.....	36

4. ¿En que fase del ciclo celular se produce el arresto?	39
5. Cambios en la expresión de p19 modulan el programa senescente.....	41
5.1 Arresto del ciclo	41
5.2 Actividad β-galactosidasa positiva	42
6. La inducción de la expresión de p19 esta regulada a nivel transcripcional.....	44
6.1 La actividad del promotor de p19 aumenta en respuesta a la inducción del mecanismo de senescencia	45
6.2 ¿Esta involucrado el factor E2F en la inducción de p19?	47
6.3 ¿Cual es la región regulatoria mínima necesaria para la inducción de p19 en senescencia?	51
7. Vías de transducción de señales involucradas en la inducción de la expresión de p19 en senescencia.....	54
7.1 ATM y ATR son necesarias para la inducción de p19 en senescencia	54
7.2 La inducción de p19 en senescencia depende de Chk1 y no de Chk2.....	56
7.3 p38, una quinasa activada por estrés, esta involucrada en la inducción de p19 en senescencia	58
7.4 p53 esta involucrada en la inducción de p19 en respuesta a senescencia genotóxica.....	59
8. Unión de p19 a la cromatina en respuesta a senescencia	61
8.1 p19 interacciona fuertemente con la cromatina en respuesta a senescencia genotóxica.....	62
8.2 p19 se une a la heterocromatina en respuesta a senescencia	66
9. ¿Hay una correlación fisiológica entre la inducción de p19 y el envejecimiento?.....	67
DISCUSIÓN.....	72
Inducción de p19 en respuesta a distintos tipos de senescencia: ¿supresor tumoral encubierto?	73
Inducción de p19 asociada al establecimiento y mantenimiento de la senescencia: ¿marcador temprano de este estado?	75
Regulación transcripcional del aumento de p19 y vías de señalización involucradas en su activación	76
Localización subcelular de p19 en respuesta a la activación de la senescencia	77
Aumento de la expresión de p19 en ratones de distintas edades	78
Modelo propuesto	80
MATERIALES Y MÉTODOS.....	81
1. Cultivo de líneas celulares	82
1.1 Medios de cultivo y células utilizadas	82
1.2 Obtención de MEFs	82
1.3 Determinación del número de células y su viabilidad.....	82
Células/ ml = (N/ 4) x 1.000 x 2 x 10	83
1.4 Generación de líneas estables para p19INK4d.....	83
2. Actividad β-galactosidasa asociada a senescencia (SA β-Gal)	83
3. Incorporación de ³ H-timidina.	84
4. Ensayo de cese de proliferación por recuento de células	84
5. Preparación de plásmidos	84
5.1 Obtención de bacterias competentes.....	84
5.2 Transformación de bacterias competentes.....	85
5.3 Preparación de plásmidos en baja escala (miniprep).....	85
5.4 Preparación de plásmidos en gran escala (maxiprep).....	85
5.5 Análisis de las preparaciones plasmídicas.....	85
6. Análisis de RNA por Northern Blot	86

6.1 Obtención de RNA total	86
6.2 Electroforesis de RNA.....	86
6.3 Transferencia de RNA a membrana	87
6.4 Marcación de sondas	87
6.5 Hibridización	88
6.6 Autorradiografía y cuantificación.....	88
7 Análisis de proteínas por Western Blot	88
7.1 Preparación del lisado celular total.....	88
7.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida	89
7.3 Transferencia a membrana.....	89
7.4 Detección de proteínas	90
8. Estudio de la tasa de iniciación de la transcripción. Ensayo de “ <i>Nuclear Run on</i> ”	91
8.1 Aislamiento de núcleos.....	91
8.2 Radiomarcación del RNA nuclear.....	92
8.3 Obtención del RNA	92
8.4 Preparación de sondas de cDNAs.....	92
8.5 Hibridización	93
9. Determinación de la actividad transcripcional del promotor de p19INK4d.....	93
9.1 Transfección de células en cultivo.....	93
9.2 Preparación de extractos celulares.....	94
9.3 Determinación de la actividad de β -galactosidasa.....	94
9.4 Determinación de la actividad de Cloranfenicol acetil transferasa	95
10. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo	95
11. Inmunocitoquímica.....	96
12. Fraccionamiento subcelular y aislamiento de la cromatina.....	96
13. Fraccionamiento y separación de heterocromatina y eucromatina.....	98
14. Extracción de tejidos en ratones de distintas edades	99
BIBLIOGRAFÍA	101

INTRODUCCIÓN

1. Senescencia Celular

La senescencia celular es un programa de señales de transducción que lleva a un arresto irreversible del ciclo, acompañado por un conjunto de cambios en el fenotipo celular (Shay and Roninson, 2004). Este mecanismo se diferencia del estado de quiescencia dado que, este último, consiste en un arresto reversible del ciclo celular. Ante la presencia de estímulos adecuados la célula quiescente reanuda su entrada al ciclo (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

El mecanismo de senescencia fue descubierto hace más de cuatro décadas cuando Hayflick y colegas observaron que las células en cultivo tenían un número finito de divisiones y que las mismas una vez arrestadas no crecían a pesar de la presencia de nutrientes y factores de crecimiento en el medio de cultivo (Hayflick, 1965).

2. Las dos caras de la senescencia

Poco tiempo después del descubrimiento de que las células no crecen indefinidamente en cultivo surgieron dos hipótesis para explicar este fenómeno las cuales, para ese momento, eran muy especulativas y contradictorias. La primera surgió a partir del hecho que las células tumorales crecen indefinidamente en cultivo, por lo que la senescencia celular constituiría un mecanismo supresor de tumores. En este contexto la senescencia representaría un mecanismo beneficioso para los organismos dado que los protegería del cáncer. La segunda hipótesis surgió del hecho que la regeneración y reparación tisular se deteriora con la edad, por lo que la senescencia contribuiría con la pérdida de la capacidad regenerativa de las células *in vivo*. En este contexto la senescencia celular es considerada deletérea dado que esta involucrada en la disminución de la renovación y función tisular.

Por muchos años estas dos teorías fueron consideradas independientemente, sin embargo la comprensión de este mecanismo fue creciendo con los años y estas dos hipótesis se unieron dando una nueva visión sobre el envejecimiento y enfermedades como el cáncer (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007)

3. La senescencia celular en un contexto evolutivo

Para entender como este mecanismo puede ser tanto beneficioso como deletéreo y el origen de su regulación, es importante comprender la naturaleza del cáncer y la teoría evolutiva del envejecimiento.

El cáncer es uno de los mayores desafíos que deben enfrentar los organismos superiores con tejidos renovables ya que los mismos, al estar compuestos por células en continua proliferación, corren el riesgo de sufrir una transformación maligna (Hanahan and Weinberg, 2000). Además, el cáncer se inicia y en gran medida se desarrolla debido a mutaciones somáticas (Bishop, 1995) y las células en continua proliferación corren el riesgo de adquirir mutaciones más rápidamente que las células que no se dividen (Busuttil et al., 2006).

El peligro que representa el cáncer para los organismos con tejidos renovables fue mitigado por la evolución de mecanismos supresores de tumores, de los cuales la senescencia forma parte de ellos impidiendo el crecimiento de células tumorales (Braig and Schmitt, 2006; Sager, 1991).

Se plantea que la senescencia evolucionó a partir de un ambiente en continuo riesgo, como infección, predación e inanición, por lo que la vida media de los organismos era mucho más corta debido a los riesgos a los que estaban expuestos. De manera que un mecanismo supresor de tumores debía ser efectivo en período corto de tiempo (algunas décadas para los humanos y meses para los ratones). Sin embargo, la senescencia podría ser deletérea más tarde porque contribuiría con el envejecimiento al afectar directamente la capacidad regenerativa de los tejidos, la cual se vería disminuida por la acumulación de células senescentes. La presión de selección, para eliminar estos efectos adversos, sería muy pequeña dado que el ambiente donde evolucionó este mecanismo los organismos no vivían lo suficiente como para experimentar estos efectos antagónicos (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007; van Heemst et al., 2007).

Este tipo de mecanismos beneficiosos o deletéreos dependiendo de la edad del organismo es la esencia del “*Antagonismo Pleiotrópico*” una teoría evolutiva del envejecimiento formulada por Williams en 1957 (Williams 1957). Williams reforzó la idea que la fuerza de la selección natural declina con la edad, así, el efecto negativo del envejecimiento no es una característica seleccionada, sino más bien, una consecuencia de la fijación de alelos en la evolución por su ventaja reproductiva a edades tempranas con efectos adversos en el período post reproductivo (van Heemst et al., 2007).

3.1 ¿La senescencia suprime o promueve el cáncer?

A pesar de la gran cantidad de evidencia experimental que postula a la senescencia como un mecanismo supresor de tumores, recientes trabajos han sugerido que células

senescentes presentes en el estroma celular podrían promover la proliferación y transformación del epitelio subyacente (Coppe et al., 2006; Krtolica et al., 2001). Los tumores malignos requieren de un tejido permisivo para proliferar y migrar, por lo que se plantea que las células senescentes acumuladas en el estroma de tejidos envejecidos secretarían componentes a la matriz extracelular como citoquinas inflamatorias y metaloproteasas (*senescence-associated secretory phenotype* SAPS) que podrían disrumpir la integridad tisular y promover la proliferación (Rodier and Campisi, 2011; Rodier et al., 2009).

La idea que la senescencia por un lado este establecida como un mecanismo supresor de tumores y por otro que sea capaz de promoverlo parece paradójico. Pero se explica desde el punto de vista del *Antagonismo Pleiotrópico* (anteriormente explicado). Un proceso biológico puede ser beneficioso o deletéreo dependiendo de la edad del organismo. Así, este mecanismo que fue seleccionado para aumentar el estado saludable (“*fitness*”) en un organismo joven, por ejemplo actuando como un supresor tumoral, puede ser deletéreo con la edad promoviendo enfermedades asociadas al envejecimiento incluyendo el cáncer (Rodier et al., 2009).

4. Características de la célula senescente

Para identificar una célula senescente existen varios marcadores, los cuales deben analizarse en conjunto ya que ninguno es completamente específico. Más aún no todas las células senescentes expresan todos los marcadores, pero si se analizan en conjunto definen este estado.

4.1 Arresto del ciclo

En senescencia el arresto es permanente y no puede ser revertido por estímulos fisiológicos. Una vez que las células se encuentran arrestadas no pueden iniciar la replicación del ADN a pesar que se encuentren en condiciones óptimas de crecimiento y metabólicamente activas, contrario a lo que ocurre en el estado de quiescencia en donde el arresto puede ser revertido. La mayoría de las veces el arresto se produce en células con un contenido de ADN que corresponde a la fase G1 del ciclo (Di Leonardo et al., 1994; Serrano et al., 1997). Sin embargo dependiendo del tipo celular y el estímulo de

origen el arresto puede ocurrir en S y G2-M del ciclo celular (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007; Wada et al., 2004).

4.2 Cambios en el fenotipo celular

Se observó que las células senescentes presentan una morfología alargada, aplanada y un aumento en el tamaño celular de hasta dos veces (comparado con la contraparte no senescente) (Hayflick, 1965).

4.3 Actividad β -Galactosidasa positiva a pH=6

Dado que la falta de replicación es el principal marcador, este no permite diferenciar las células senescentes de aquellas que se encuentran en estado quiescencia o completamente diferenciadas. La actividad β -galactosidasa positiva (*Senescence Associated β galactosidase SA- β gal*) es uno de los marcadores más específicos y uno de los primeros en ser identificados (Dimri et al., 1995). Este se utiliza tanto *in vivo* como *in vitro* y es detectado por tinción cito-histoquímica utilizando el sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal) y se cree que es consecuencia del aumento en el contenido lisosomal que poseen las células senescentes (Lee et al., 2006). Esta SA- β gal ha sido detectada en distintos órganos de individuos y organismos envejecidos, sugiriendo que las células senescentes se acumulan en los tejidos con la edad (Melk et al., 2003; Pendergrass et al., 1999; Sigal et al., 1999).

Todas las células tienen actividad β -galactosidasa positiva a pH=4-4,5 (Zhang et al., 1994), no ocurriendo lo mismo a pH=6, condición necesaria para que la tinción sea específica del mecanismo de senescencia (Kurz et al., 2000). Sin embargo esta actividad puede dar positiva cuando las células se encuentran en alta densidad (Krishna et al., 1999).

4.4 Cambios en la expresión génica

La mayoría de las células senescentes presentan notables cambios en la expresión génica, especialmente en los genes asociados a la activación e inhibición del ciclo celular (Jackson and Pereira-Smith, 2006; Zhang et al., 2003). p16INK4a y p21CIP1 dos inhibidores del ciclo (*Cyclin-dependent kinase inhibitor CKIs*) tienen una expresión aumentada en senescencia (Braig and Schmitt, 2006; Campisi, 2001). Estos CKIs forman parte de las vías de señalización gobernadas por los supresores tumorales p53 y

pRb, los cuales se encuentran frecuentemente desregulados en cáncer (Sherr and McCormick, 2002). Ambas vías de señalización pueden establecer y mantener el arresto del ciclo en senescencia. p21 es inducida por p53 y junto a p16 mantienen activada a pRb en su forma hipofosforilada (Jackson and Pereira-Smith, 2006).

Por otro lado las células senescentes reprimen genes que codifican para proteínas que estimulan o facilitan la progresión del ciclo celular, entre ellas, c-fos, ciclina A y ciclina E (Narita et al., 2003; Stein et al., 1991).

4.5 Formación de foci de heterocromatina (Senescence-associated heterochromatin foci SAHF)

Cuando las células senescentes son teñidas con colorantes afines al ADN como el diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), se observan foci esparcidos en el núcleo, mientras que células no senescentes presentan un patrón de tinción uniforme (Narita et al., 2003). Se cree que estos foci corresponden a cromatina altamente compactada, encargada de silenciar genes asociados con la progresión del ciclo celular. Mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) se observó que los promotores de los genes blanco de E2F (asociados a proliferación) se volvían heterocromáticos, de manera simultánea a la aparición de SAHF (Narita et al., 2003). Esta heterocromatinización de genes encargados de la progresión del ciclo celular es observada en senescencia, no ocurriendo lo mismo en células proliferantes o en estado de quiescencia. Por lo cual se cree que esta alteración en la estructura de la cromatina contribuiría con la irreversibilidad del proceso de senescencia (Braig and Schmitt, 2006; Narita et al., 2003).

4.6 Formación de foci asociados al daño al ADN (Senescence-associated DNA damage foci SDFs)

Algunas células senescentes también pueden ser identificadas por la formación de foci asociados a una activación persistente de la respuesta general al daño “DNA Damage Response (DDR)” (Takai et al., 2003). Estos foci contienen proteínas asociadas al daño al ADN como histona H2AX fosforilada (γ -H2AX) y p53 binding protein 1 (53BP1). Las mismas son reclutadas a los sitios de daño de manera transitoria cuando las lesiones son reparables, sin embargo en senescencia se observó que estos foci se expresan constitutivamente y se cree que esto es esencial para la irreversibilidad del arresto (d'Adda di Fagagna et al., 2003; Rodier et al., 2011)

5. Causas de senescencia

Dependiendo del estímulo que le de origen podemos diferenciar dos tipos de senescencia. Uno de ellos es la *senescencia intrínseca o replicativa*, muy relacionada al número finito de divisiones que posee una célula en cultivo e inducida principalmente por el acortamiento de los telómeros en cada división y aumento de las especies reactivas de oxígeno (R.O.S) (Harley et al., 1990). El otro tipo es la *senescencia extrínseca o prematura* la cual es provocada por un estímulo exógeno estresante como por ejemplo daño al ADN, actividad oncogénica, falta de nutrientes y de factores de crecimiento etc. (Ogryzko et al., 1996; Serrano et al., 1997).

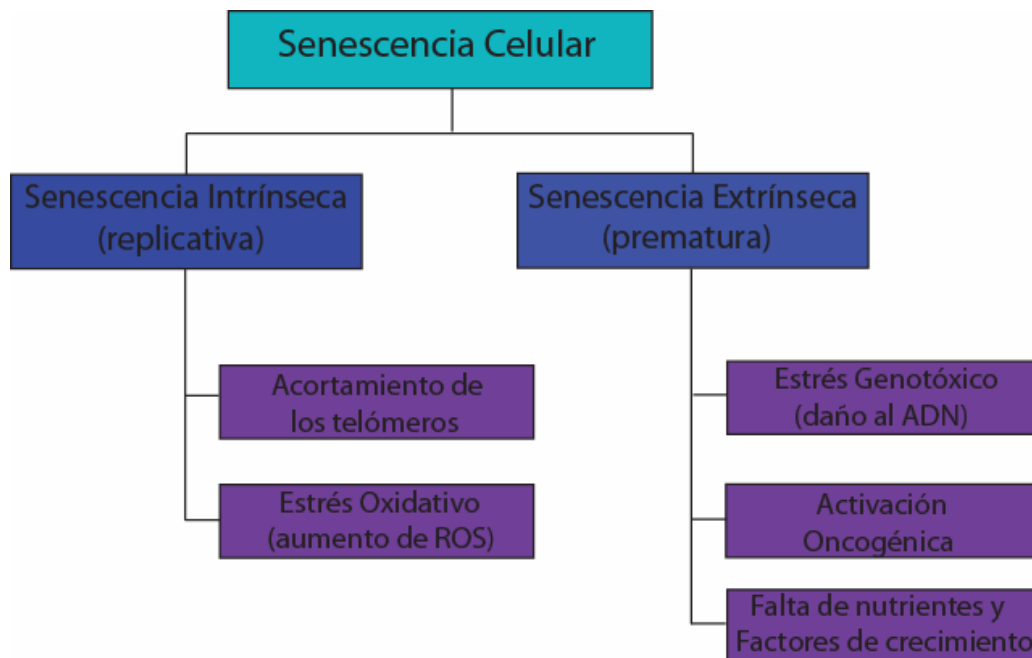


Fig. I: Diagrama que muestra los distintos tipos de senescencia según el estímulo que la origine.

5.1 Senescencia causada por el acortamiento de los telómeros

Los telómeros son regiones de ADN no codificante, altamente repetitivas (repeticiones hexaméricas en tandem) que se encuentran en los extremos de los cromosomas de las células eucariotas, cuya función principal esta asociada a la estabilidad estructural de los cromosomas (Harley et al., 1990).

El acortamiento gradual de los telómeros en cada división celular, debido a la imposibilidad de la maquinaria de replicación de completar la síntesis al comienzo de la replicación de la cadena retrasada, juega un rol fundamental en la inducción de la

senescencia replicativa (Bodnar et al., 1998; Harley et al., 1990). La exposición de los extremos cromosómicos es sentido en la célula como daño de doble cadena, dando como resultado la activación persistente de la DDR. Como se dijo en la sección anterior, recientes estudios demostraron la activación de proteínas asociadas a DDR (ATM, ATR, γ H2AX y 53BP1 entre otras). Se observó que las mismas colocalizan con los extremos de los cromosomas que perdieron los telómeros formando SDFs (d'Adda di Fagagna et al., 2003). Estos resultados sugieren que una de las causas por las cuales se produce el arresto irreversible en senescencia replicativa sería la activación persistente en el tiempo de la DDR. Aunque la severidad del daño al ADN es probablemente un factor importante, poco es lo que sabe sobre como la célula decide entre una activación transitoria o persistente de la DDR, esta última observada en muchas células senescentes (d'Adda di Fagagna, 2008).

5.2 Senescencia causada por estrés oxidativo

Durante el envejecimiento hay una acumulación intracelular de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Esto ocurre debido a una disminución en la actividad de las enzimas encargadas de eliminar o neutralizar estas especies. El aumento de ROS se sabe que puede causar tanto daño al ADN como un acortamiento más rápido de los telómeros (Parrinello et al., 2003).

Se demostró que las células de ratón entran en senescencia después de un determinado número de pasajes en cultivo, pero a diferencia de las células humanas, este mecanismo es causado por estrés oxidativo y no por acortamiento de los telómeros dado que las células de ratón poseen telómeros más largos (>20Kb). La activación del mecanismo de senescencia en estas células es provocado por las condiciones estándares de cultivo, con niveles de oxígeno por encima de los fisiológicos (20%), en las cuales las células de ratón son mucho más sensibles al daño causado por estrés oxidativo que las humanas (Parrinello et al., 2003).

Distintos estudios demuestran que tanto el tratamiento con peróxido de hidrógeno como la inhibición de enzimas encargadas de la eliminación de ROS (ej. superóxido dismutasa) causan senescencia prematura (Blander et al., 2003). La célula, en respuesta al aumento de ROS, activa las vías de señalización asociadas a p53 y pRb, las cuales activan a p21 y p16, respectivamente, produciendo el arresto del ciclo (Ben-Porath and Weinberg, 2005). Particularmente se observó que p16 puede ser activada, en respuesta a estrés oxidativo, por p38-MAPK una quinasa activada por estrés (*stress-activated*

protein family SAPK) (Iwasa et al., 2003). Esta familia de proteínas responde a distintos tipos de estrés (fisiológicos y oxidativos) activando tanto senescencia como apoptosis (Kyriakis and Avruch, 2001).

5.3 Senescencia causada por estrés genotóxico

El daño directo al ADN, ya sea por irradiación o por el uso de agentes dañadores, puede inducir senescencia. Normalmente la respuesta celular al daño comprende el arresto del ciclo para llevar a cabo la reparación. Si la magnitud del daño es muy grande la respuesta puede comprender la apoptosis o el arresto irreversibles del ciclo. Es así que el mecanismo activado depende del tipo de daño, la dosis administrada y el tipo celular tratado (Wahl and Carr, 2001). La activación de moléculas asociadas a DDR en senescencia se mantiene en el tiempo y se cree que podrían promover una señal constitutiva para la inducción y activación de p53 (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Sin embargo, en senescencia genotóxica, se ha observado también el aumento de p16, aunque con una cinética un tanto retrasada. Se cree que esta inducción representa una segunda barrera para prevenir el crecimiento de células dañadas.

La importancia de la inducción de este tipo de senescencia surge de la observación que, muchas drogas usadas en quimioterapia que causan un daño severo en el ADN, inducen senescencia en células normales y a su vez también inducen este mecanismo en algunas células tumorales en cultivo e *in vivo* (Roninson, 2003). Sin embargo, la senescencia es usualmente inducida a bajas concentraciones del agente dañador en comparación a la inducción de apoptosis la cual es activada a altas dosis del genotóxico (Ben-Porath and Weinberg, 2005). Células tumorales que tienen la versión salvaje de p53 tienen más probabilidades de activar el mecanismo de senescencia en respuesta a la quimioterapia tanto *in vitro* como *in vivo* (Roberson et al., 2005; te Poele et al., 2002). Por lo tanto, desde un punto de vista práctico, las drogas que inducen daño al ADN tienen más probabilidades de ser eficaces en tumores que senescen que en aquellos que no lo hacen.

5.4 Senescencia inducida por activación oncogénica

Los oncogenes son versiones mutadas de genes normales que tienen el potencial de transformar células en conjunto con mutaciones adicionales. Células normales responden a la sobreexpresión de oncogenes entrando en estado de senescencia. Este fenómeno fue observado cuando una forma activada del oncogén RAS (HRAS^{V12}) fue

expresado en fibroblastos humanos normales, induciendo primero un aumento en la proliferación celular seguido del arresto asociado a senescencia (Serrano et al., 1997). Este proceso representa un mecanismo supresor de tumores por el cual las células previenen la proliferación descontrolada en respuesta a la activación de oncogenes (Serrano et al., 1997).

Muchos oncogenes inducen una robusta DDR por la gran acumulación de daño al ADN que es consecuencia de la proliferación celular aberrante. Se demostró que la activación de DDR es necesaria tanto para la iniciación como para el mantenimiento del estado de senescencia inducido por oncogenes ya que, inhibiendo la expresión de ATM, se impide la senescencia permitiendo la proliferación aberrante con una alta predisposición a la transformación maligna (Bartkova et al., 2006; Di Micco et al., 2006).

6. Vías de señalización involucradas

Las vías de señalización de p53 y Rb-p16, juegan un rol central en la inducción de la senescencia, siendo los principales efectores moleculares de este mecanismo. Ambos son activados en respuesta a senescencia y pueden actuar de manera independiente o en combinación dependiendo del estímulo de origen. La proteína p53 es estabilizada y activa a su gen blanco, p21, el cual induce el arresto del ciclo (Brown et al., 1997). Tanto p16 como p21 mantienen a pRb en su forma activa hipofosforilada la cual secuestra a los factores E2F impidiendo de esta manera que se activen sus blancos moleculares y en consecuencia evitar la progresión del ciclo celular (Sherr and McCormick, 2002).

Por lo general estímulos que inducen una potente DDR (acortamiento de los telómeros y estrés genotóxico) activan la senescencia principalmente a través de p53. Esta proteína es estabilizada porque ARF inhibe a Mdm2, una proteína encargada de marcar a p53 para su degradación (Sherr and McCormick, 2002).

Sin embargo cuando el estímulo que origina la senescencia es estrés oncogénico u oxidativo se activa preferentemente la vía p16-pRb. Se piensa que esta vía es activada en gran parte por acción de p38, una quinasa activada por estrés, la cual se vio que se induce principalmente por el aumento de ROS (Iwasa et al., 2003). Un resultado interesante sugiere que la sobreexpresión de RAS induce senescencia en parte por la gran producción de ROS (Lee et al., 1999). Este efecto explicaría la acción de p38 en este tipo de senescencia.

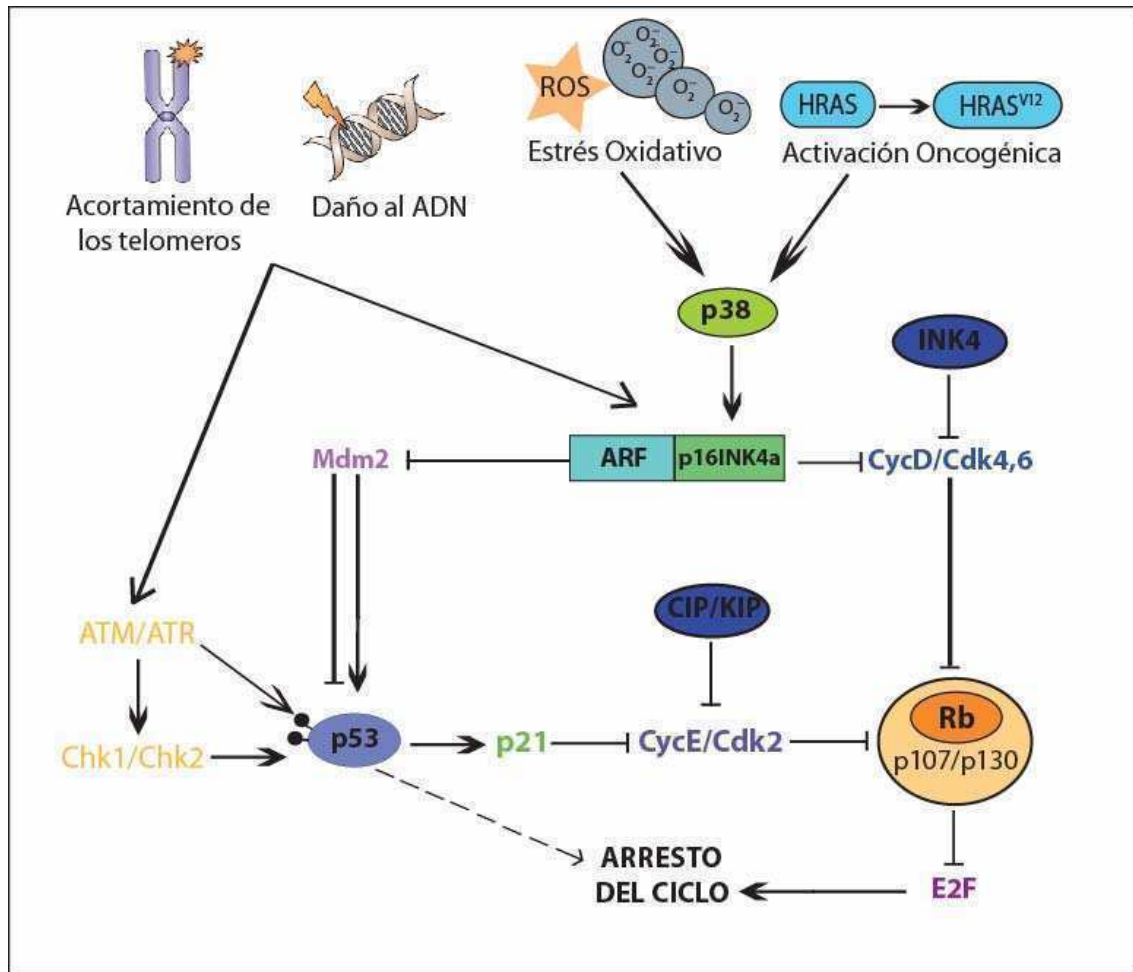


Fig. II: Vías de señalización involucradas en senescencia. Rb puede ser activada por p16 o por p21 a través p53. A su vez la inducción de p16 esta mediada por p38 en respuesta a estrés oxidativo y activación oncogénica. Por otra parte p53 es activada por fosforilación mediada por ATM/ATR y Chk1/Chk2 cuando el estímulo esta asociado al daño al ADN. p53 también es estabilizada por ARF, la cual secuestra a Mdm2 impidiendo que la misma marque a p53 para su degradación. (Fig. adaptada de I. Ben-Porath et al., 2005)

7. Mantenimiento del estado de senescencia: Cambios en la estructura de la cromatina

Recientemente, se ha propuesto que la célula posee al menos dos mecanismos para asegurar la irreversibilidad del arresto en senescencia. Uno de ellos es la activación persistente de la respuesta general al daño DDR, la cual interviene imponiendo un checkpoint permanente (Di Leonardo et al 1994; d’Adda di Fagagna, F , 2008; d’Adda di Fagagna, F. et al, 2003). El otro mecanismo esta asociado a la heterocromatinización global del ADN y en consecuencia la formación de SAHF (*senescence-associated heterochromatin foci*) los cuales, como se dijo anteriormente, corresponden a cromatina altamente compactada encargada de suprimir la transcripción de genes asociados a la

proliferación celular (Narita et al, 2003; Zhang, R., Chen, W. & Adams, P. D, 2007; Funayama, R. & Ishikawa, F., 2007). Se observó que las células senescentes son más resistentes al tratamiento con DNAsa y por lo general, en los SAHF, hay un aumento de histona H3 dimetilada y trimetilada en Lisina 9 y 27 (H3K9me2, H3K9me3 y H3K27me3). Estas modificaciones post-traduccionales de histonas están involucradas con los mecanismos de silenciamiento en mamíferos. También se observó el reclutamiento de proteínas asociadas al empaquetamiento de la cromatina (heterochromatin protein HP1 $\alpha\beta\gamma$) y, más aún, se determinó que la RNA pol II está excluida de los SAHF (Decottignies and d'Adda di Fagagna, 2011; Di Micco et al., 2007).

Dado que no se observó un aumento marcado de H3K9me en células senescentes se sugiere que en senescencia hay una redistribución de los marcadores de heterocromatina más que un incremento de los mismos (Di Micco et al., 2007; Funayama et al., 2006).

p16-Rb es la vía de señalización involucrada en la formación de SAHF, Rb se une a SUV39H1, una histona metiltransferasa responsable de la metilación de H3K9. Se observó que la inactivación de Rb previene la formación de SAHF en el establecimiento de la senescencia (Narita et al., 2003). Por otro lado, la contribución de p53 a la formación de SAHF es una tanto controversial dado que, por un lado, se observó que utilizando una forma dominante negativa de p53, que no induce la expresión de p21, no se afecta la formación de SAHF (Narita et al., 2003). Sin embargo, estudios recientes muestran que p53 contribuye a la formación de SAHF dado que, inactivando a p400 (una proteína remodeladora de la cromatina), se obtiene como resultado la inducción de senescencia p53 dependiente - Rb independiente, con la correspondiente formación de SAHF (Chan et al., 2005).

Los SAHF no solo fueron observados en cultivos *in vitro*, sino también durante estadios tempranos del cáncer *in vivo* (Collado et al., 2005). Adenomas premalignos mostraron una señal fuerte para γ HP1, probablemente asociado a la formación de SAHF, con la correspondiente aparición de otros marcadores de senescencia como aumento de la expresión de p16 y actividad SA- β Gal, mientras que esto no fue observado en el carcinoma maligno.

Estas observaciones sumadas al hecho que mediante este mecanismo se suprime la expresión de genes asociados a la progresión del ciclo, sugieren que la formación de SAHF juega un rol fundamental en la supresión de la progresión tumoral *in vivo* (Funayama and Ishikawa, 2007).

8. Significado e importancia de la senescencia *in vivo*

8.1 Senescencia y cáncer

El cáncer es una enfermedad asociada con la edad, pero difiere de otras patologías en un aspecto fundamental. Para formar un tumor se necesita que las células transformadas adquieran nuevos fenotipos aberrantes (Hanahan and Weinberg, 2000). Por el contrario, en la mayoría de las enfermedades asociadas al envejecimiento las funciones celulares y tisulares fallan. En base a esto estas patologías son degenerativas mientras que el cáncer difícilmente puede ser considerado una enfermedad degenerativa.

La mayoría de los estímulos que inducen senescencia son potencialmente oncogénicos y una célula transformada debe adquirir mutaciones que le permitan evitar la senescencia. Estas mutaciones ocurren típicamente en vías de señalización asociadas a p53 y p16-Rb (Cosme-Blanco et al., 2007; Chen et al., 2005; Hanahan and Weinberg, 2000). No obstante hay muchas instancias en las cuales la pérdida del mecanismo de senescencia pareciera ser un paso crucial pero insuficiente para el desarrollo del cáncer. Ratones transgénicos deficientes en p53 fallan en activar la senescencia ante un estímulo apropiado y por consiguiente son propensos al desarrollo oncogénico (Braig et al., 2005; Chen et al., 2005).

Por otro lado también existen evidencias que los factores secretados por las células senescentes (SAPS) pueden afectar contribuyendo a estimular el fenotipo maligno de células tumorales vecinas (Coppe et al., 2008).

El desarrollo del cáncer requiere de la proliferación celular, por lo que cualquier mecanismo que suprima el crecimiento de las células va a suprimir el desarrollo oncogénico. Sin embargo, parecería ser que la senescencia es una barrera pero no un obstáculo insuperable para la progresión del cáncer (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007).

8.2 Senescencia y envejecimiento

La relación existente entre la senescencia y el envejecimiento es mucho más evidente y menos compleja que la relación observada con el cáncer. Dado que se observó en ratones, primates y humanos que hay un incremento en el número células senescentes directamente relacionado a la edad (Campisi, 2005; Dimri et al., 1995; Jeyapalan et al., 2007).

Se sugieren tres hipótesis posibles para explicar porque la senescencia contribuiría con el envejecimiento. La primera de ellas plantea que la senescencia depletaría a los tejidos

de células progenitoras (*stem cells*), afectando la reparación de los mismos, el recambio y la regeneración tisular (Drummond-Barbosa, 2008).

La segunda sugiere que los factores que secretan las células senescentes afectan procesos vitales como el crecimiento, migración, arquitectura tisular, formación de vasos sanguíneos y diferenciación, procesos que están altamente controlados y cuya desregulación puede promover el crecimiento tumoral (Liu and Hornsby, 2007).

La tercera esta asociada a la secreción de citoquinas inflamatorias por parte de las células senescentes. La inflamación es un marcador del envejecimiento ya que puede destruir a las células y tejidos dado que produce potentes oxidantes (Franceschi et al., 2008). Además se pueden ver afectados los nichos de progenitores celulares y también se puede estimular un fenotipo maligno (Grivennikov et al., 2010).

Estudios realizados en ratones transgénicos que poseen una versión de p53 hiperactivada demuestran que, estos ratones, son libres de tumores, lo cual no es sorprendente en vista de la función de supresor tumoral asociada a p53 (Tyner et al., 2002; Wada et al., 2004). Sí fue sorprendente el envejecimiento prematuro de estos ratones y su corta vida media. Los mismos presentaban pérdida de fertilidad, osteoporosis, pérdida de grasa subcutánea, retardo en la curación de heridas y otras anomalías relacionadas con el envejecimiento. Las células de estos ratones experimentaban una senescencia temprana en cultivo y gran acumulación de células senescentes en los tejidos (Wada et al., 2004). Estas evidencias están de acuerdo con la teoría del antagonismo pleiotrópico, que plantea un balance entre el beneficio de suprimir el cáncer en organismos jóvenes con la consecuencia del desarrollo de un fenotipo deletéreo en edades tardías (Campisi, 2003; Campisi, 2005)

8.3 Importancia de la inducción del mecanismo de senescencia

Se asume que la mayoría de las drogas usadas en quimioterapia ejercen el efecto antitumoral a través de la inducción de apoptosis. Sin embargo también se observó que estas drogas inducen senescencia (Chang et al., 2002). Distintas evidencias sugieren que a bajas concentraciones de las drogas usadas en quimioterapia se induce senescencia y a concentraciones mayores inducen apoptosis (Chang et al., 2002; Rebbaa et al., 2003; Zheng et al., 2004). Por otro lado, dependiendo de las alteraciones genéticas presentes en un tumor, varía la respuesta hacia un mecanismo de senescencia o apoptosis en respuesta al tratamiento de quimioterapia (Schmitt, 2003)

Las drogas que inducen senescencia representan una alternativa muy atractiva para aquellos tumores resistentes a la apoptosis. En este escenario los marcadores de senescencia jugarían un rol fundamental para monitorear la eficacia del tratamiento (Collado and Serrano, 2006).

Por otro lado, diferentes trabajos que analizan senescencia en tumores sugieren que este mecanismo está asociado con estadios pre-malignos. Se han encontrado células senescentes en adenomas de pulmón, neoplasias pancreáticas y en lesiones pre-malignas de la piel (nevus melanocítico). Sin embargo, están ausentes en los estadios malignos correspondientes: adenocarcinoma pulmonar, adenocarcinoma pancreático y melanoma (Collado et al., 2005; Michaloglou et al., 2005). Estas evidencias sugieren un rol de la senescencia como barrera para la progresión tumoral. Por lo tanto el uso de marcadores de senescencia en ensayos clínicos sería de gran utilidad para detectar el cáncer en estadios tempranos; la pérdida de estos marcadores sería indicativo de una progresión tumoral hacia estadios malignos (Collado and Serrano, 2006).

Por otro lado establecer marcadores de senescencia, bien definidos, para patologías asociadas al envejecimiento tendría un fuerte impacto en el diagnóstico. El hecho de poder diagnosticar tempranamente y prevenir enfermedades asociadas a la edad permitiría sentar las bases para una intervención farmacológica que posponga el envejecimiento y las patologías asociadas al mismo.

9. Rol de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclina (CKIs) en senescencia

El pasaje de una a otra fase del ciclo celular se encuentra estrictamente controlado por una gran cantidad de proteínas involucradas en regular tanto positiva como negativamente la progresión del ciclo. El control riguroso de este proceso evita la iniciación de la fase siguiente sin que la anterior haya sido completada satisfactoriamente (Bulavin et al., 2002; Hartwell and Weinert, 1989), contribuyendo a la fidelidad en el mantenimiento y en la transferencia de la información genética (Zhou and Elledge, 2000). Como factores principales en la regulación se encuentran: las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) que fosforilan a diversas proteínas en serinas y treoninas, las ciclinas que regulan la actividad quinasa de las CDKs, y las proteínas inhibidoras de CDKs (CKIs). Estas proteínas integran el flujo de información

proveniente desde el exterior celular para dirigir el inicio del ciclo celular y la progresión a través de todas sus fases.

En mamíferos existen 2 familias de proteínas que actúan como inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (Hirama and Koeffler, 1995; Ortega et al., 2002; Sherr and Roberts, 1999; Trimarchi and Lees, 2002). La familia de las INK4 (por *inhibitors of CDK4*) compuesta por las proteínas p16INK4a, p15INK4b, p18INK4c y p19INK4d; y la familia de las Cip/Kip, formada por p21 (ó Cip1, *CDK2 interacting protein*), p27 (ó Kip1, *kinase inhibiting protein 1*) y p57 (ó Kip 2). Las Cip/Kip tienen el potencial necesario para inhibir a diferentes CDKs, principalmente CDK2-ciclina E/A y CDK1-ciclina B (Hengst and Reed, 1998; Nakayama and Nakayama, 1998) . Las 4 proteínas que conforman al grupo INK4 tienen la capacidad de unirse a CDK4/6, inhibiendo la unión de la ciclina D e impidiendo su activación.

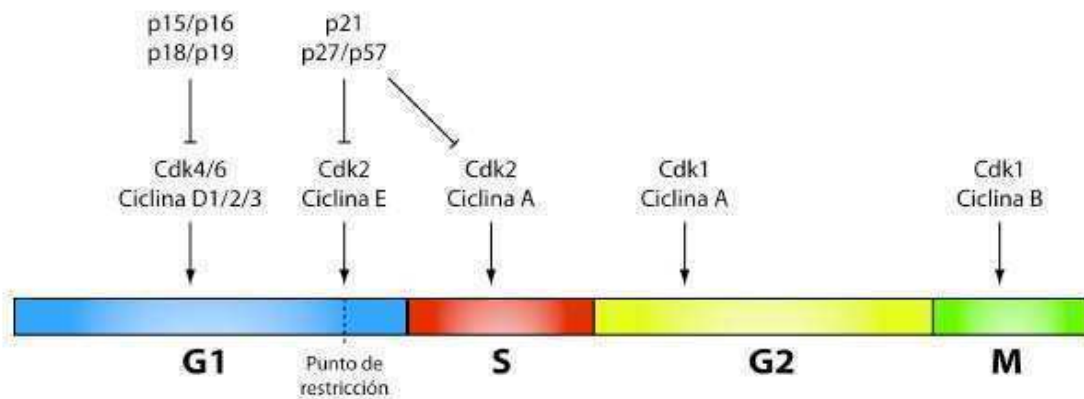


Fig. III: Regulación de los complejos ciclina – CDKs a lo largo del ciclo celular. Modificado de Trimarchi y Lees, 2002.

9.1 Familia Cip/Kip

De los miembros de la familia Cip/Kip, p21 constituye un biomarcador de senescencia ya que se observó su inducción en respuesta a distintos tipos de senescencia y en diversos tipos celulares (Braig and Schmitt, 2006; Bringold and Serrano, 2000; Campisi, 2001). p21 es activada por p53, en consecuencia se une e inhibe al complejo cdk2/ciclinaE y contribuye a mantener a Rb en su forma activa hipofosforilada causando el arresto del ciclo (Jackson and Pereira-Smith, 2006).

9.2 Familia INK4

Esta familia esta compuesta por cuatro miembros: p16INK4a (p16), p15INK4b (p15), p18INK4c (p18) y p19INK4d (p19) (Chan et al., 1995; Guan et al., 1996; Hannon and

Beach, 1994; Hirai et al., 1995; Serrano et al., 1993). Las mismas se unen e inhiben las quinasas CDK4 y CDK6 (Serrano et al., 1993).

Las proteínas INK4 están generalmente mutadas o inactivadas en diversos tipos de cánceres y representan supresores tumorales o candidatos a serlo (Roussel, 1999). Aunque parecen ser funcionalmente redundantes en su capacidad de inhibir el ciclo celular, los cuatro miembros son expresados diferencialmente durante el desarrollo y están involucrados en diferentes eventos celulares (Canepa et al., 2007; Cunningham and Roussel, 2001)

De los cuatro miembros de esta familia, p16 constituye un biomarcador de senescencia ya que se observó un aumento en su expresión en respuesta a varios tipos de senescencia y en diversos tipos celulares (Braig and Schmitt, 2006; Campisi, 2001). También se observó un marcado incremento en la expresión de p16 asociado al envejecimiento en tejidos de ratones y humanos (Zindy et al., 1997). Como ya se mencionó anteriormente, p16 está involucrada en el arresto irreversible del ciclo manteniendo a Rb en su forma activa hipofosforilada. A su vez también se vio que está involucrada en la formación de SAHF (Narita et al., 2003).

Recientemente se ha reportado que dos proteínas miembros de esta familia, p16INK4a y p19INK4d, estarían involucradas en la reparación del DNA y la apoptosis inducida por diversos agentes genotóxicos (Al-Mohanna et al., 2004; Ceruti et al., 2005; Tavera-Mendoza et al., 2006). En nuestro laboratorio hemos demostrado que los niveles de p19INK4d son inducidos en respuesta a diferentes genotóxicos (UV, péptido β -amiloide, neocarzinostatin, H_2O_2 o radiación ionizante) y que esto incrementa la reparación del DNA dañado en diversos tipos celulares, al mismo tiempo que disminuye la apoptosis celular. Las células que expresan p19 presentan menor número de aberraciones cromosómicas y mayor supervivencia frente a genotóxicos que las deficientes en dicha proteína (Ceruti et al., 2005; Ceruti et al., 2009; Scassa et al., 2007). Además de ser inducida luego de la injuria genotóxica, p19 es fosforilada, secuencialmente, por CDK2/CDK5 y luego por PKA con lo cual adquiere su localización nuclear y su capacidad para actuar en reparación y apoptosis. La inducción de p19 es mediada por E2F1 y su fosforilación se realiza a través de la vía ATM/ATR y Chk1/Chk2 (Carcagno et al., 2011) (Marazita M, manuscrito enviado a publicar). Estos resultados señalan un papel relevante de la proteína p19 en la DDR colaborando en el mantenimiento de la integridad genómica. Sin embargo, el mecanismo por el cual actúa así como el sitio de acción no han sido aún aclarados. En nuestro laboratorio hemos

demostrado que la señal que induce y fosforila a p19 no es el daño *per se* sino la modificación en la estructura cromatínica producida como consecuencia del daño.

9.3 p19 y su interacción con los mecanismos involucrados en el mantenimiento de la integridad genómica

Si la apoptosis o la senescencia son inhibidas por alguna razón, se incrementa el riesgo de inestabilidad cromosómica y, las células que son suficientemente robustas para sobrevivir, pueden presentar una ventaja proliferativa y conducir a la formación de tumores (Hanahan and Weinberg, 2000; Sherr, 2004). Es así, que una célula tratará primero de reparar el daño y sobrevivir; sin embargo cuando el daño sobrepasa la capacidad de reparación, la célula cambia hacia estos mecanismos.

La DDR consiste, entonces, en una respuesta integral que activa todos o alguno de los siguientes mecanismos: arresto del ciclo celular, sistemas de reparación de la lesión, apoptosis y senescencia (Harper and Elledge, 2007). La existencia de una red regulatoria que integre los distintos mecanismos de la DDR constituye una hipótesis atractiva; dicho mecanismo tendría una especial importancia en el control de la progresión de los tumores. Sin embargo las señales que gobiernan la decisión referida a si una célula inicia la reparación del DNA, arresta su ciclo celular o dispara el proceso de senescencia, y los medios por los cuales la célula integra la información proveniente de estos caminos metabólicos aún se desconocen.

De este modo y considerando la función originalmente descrita para p19 como inhibidor del ciclo celular, sugieren que la misma podría desempeñar un papel de nexo integrando la regulación del ciclo celular, la reparación del DNA, la apoptosis y senescencia.

Las células están continuamente expuestas a distintos tipos de estrés y diferentes tipos de daño tanto endógeno como exógeno y su respuesta puede ir desde una completa recuperación hasta la muerte celular. Las células proliferantes pueden iniciar una respuesta adicional adoptando un estado de arresto permanente del ciclo. Comprender las causas y consecuencias del estado de senescencia proporcionará una nueva visión de cómo las células reaccionan al estrés, especialmente el estrés genotóxico y como esta respuesta celular puede afectar a los organismos complejos en el desarrollo del cáncer y el envejecimiento (J. Campisi et al. 2007)

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general planteado en este trabajo de investigación consiste en determinar la participación de la proteína p19INK4d (p19) en la inducción y/o mantenimiento de la senescencia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar la expresión de p19 en respuesta a la activación del mecanismo de senescencia
2. Evaluar el efecto de p19 en la inducción de diferentes tipos de senescencia
3. Determinar las vías de transducción de señales e identificar los elementos y factores de transcripción involucrados en la inducción de p19 en senescencia.
4. Analizar la localización subcelular de p19 y su posible sitio de acción en respuesta a distintos estímulos senescentes.
5. Evaluar una potencial correlación entre la expresión de p19 y el envejecimiento en ratones de distintas edades.

HIPÓTESIS

A lo largo de la evolución, los organismos con tejidos renovables han desarrollado mecanismos para prevenir la tumorigénesis. La respuesta celular frente a distintos estímulos estresantes es altamente compleja e involucra una gran variedad de proteínas sensoras que transducen señales para ejecutar distintos procesos celulares. Entre ellos, se mencionan, el arresto del ciclo, reparación, apoptosis y senescencia, mecanismos que forman parte de una respuesta general encargada de mantener la integridad genómica (*DNA Damage Response* DDR).

Una de las características principales de la senescencia consiste en la incapacidad que tiene la célula para progresar en el ciclo celular. Las células senescentes están arrestadas con un contenido de ADN que corresponde a la fase G1 o G2 dependiendo del tipo celular. Este arresto es dependiente de factores que controlan la progresión del ciclo tales como las proteínas supresoras de tumores p53, pRb y p16INK4a. Si bien estos son lo principales efectores moleculares involucrados en la iniciación y mantenimiento del estado de senescencia, las proteínas que participan en los mecanismos que sostienen la irreversibilidad del arresto del ciclo, no han sido aún identificadas. Según se indicó en la introducción, la proteína p19 desempeña un papel importante en la respuesta celular frente al daño al DNA, además de ser un inhibidor del ciclo celular en la fase G1. La hipótesis que plantea este plan de investigación, considera que las propiedades que reúne p19 la convierten en un factor con potencial para participar en la iniciación y/o mantenimiento del estado de senescencia.

RESULTADOS

Modelos utilizados para senescencia por estrés genotóxico y senescencia fisiológica

Teniendo en cuenta que el daño al ADN es un agente causal común de la respuesta senescente, independientemente del estímulo que le da origen (Campisi, 2005), decidimos emplear para el presente trabajo un agente genotóxico denominado camptotecina (CPT), el cual es comúnmente usado en quimioterapia ya que inhibe la topoisomerasa I provocando daño de doble cadena (Furuta et al., 2003) Se ha reportado que esta droga a bajas concentraciones (20 nM) induce senescencia mientras que a altas concentraciones (250 nM) induce apoptosis (Han et al., 2002). Para este tipo de senescencia se emplearon principalmente fibroblastos diploides humanos (WI-38), de hamster (BHK-21) y la línea celular humana HEK293 (*Human Embryonic Kidney*).

Para el modelo de senescencia fisiológica decidimos emplear cultivos primarios de ratón (*Mouse Embryonic Fibroblasts MEFs*) extraídos a partir de embriones de día 13,5. Esta reportado que después de una número de pasajes en cultivo (5-10) los fibroblastos primarios de ratón entran en un estado de senescencia replicativa causado principalmente por estrés oxidativo (Parrinello et al., 2003)

1. Caracterización de ambos modelos mediante el análisis de distintos marcadores de senescencia

En primer lugar, y antes de estudiar la participación de p19, analizamos ciertas propiedades de los sistemas utilizados para determinar si cumplían con las características de un estado senescente.

Dado que no existe un marcador específico de este mecanismo fue necesario analizar distintos cambios morfológicos y fisiológicos a nivel celular, que en conjunto definen este estado.

1.1 Arresto del ciclo

Una de las principales características de las células senescentes es el arresto permanente del ciclo celular, el cual puede ser fácilmente detectado por la falta de replicación del ADN. Dicho arresto fue medido utilizando ensayos de incorporación de (³H)-timidina. Para el modelo de senescencia por estrés genotóxico se observó el arresto inmediato e irreversible a partir de las 24 h de tratamiento con CPT. El mismo fue confirmado en dos tipos celulares obteniéndose resultados similares (Fig. 1 A y B).

Para el modelo de senescencia fisiológica se observó el arresto del ciclo celular en función al número de pasajes en cultivo (P). Tal como se observa en la figura 2 el arresto comienza a partir del P5, acentuándose a partir del P6 y manteniéndose hasta el P9.

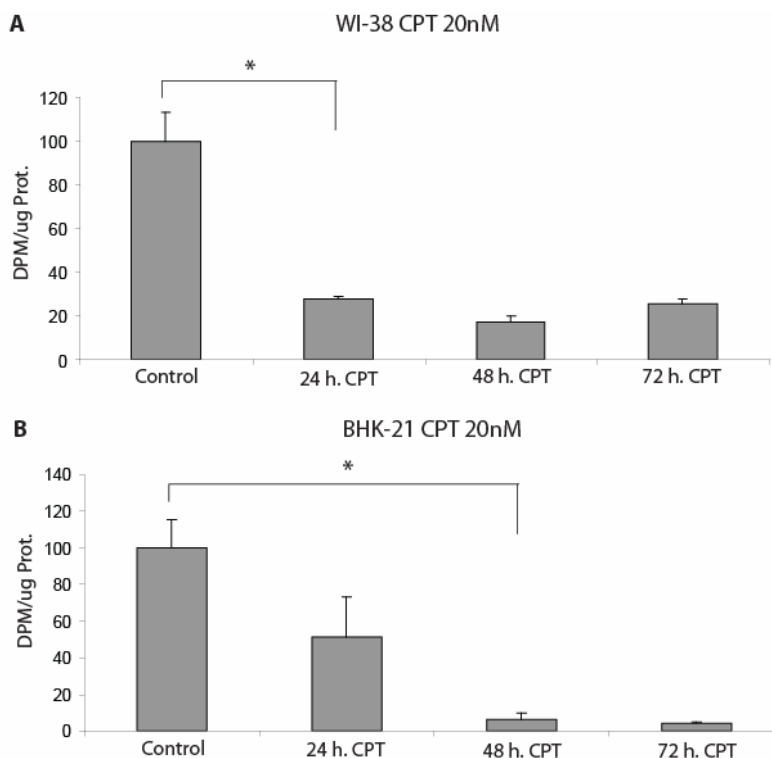


Fig. 1: Cese de incorporación de $[^3H]$ timidina. (A y B) Células WI-38 y BHK-21 respectivamente fueron tratadas con CPT 20nM por 24, 48 y 72 h. luego del tratamiento fueron incubadas con $1 \mu\text{Ci/ml}$ $[^3H]$ -timidina durante 6 horas a 37°C . Las células fueron lisadas y la incorporación de $[^3H]$ -timidina al DNA fue estimada como dpm/ μg de proteína. Las barras representan la media \pm D.E. de dos ensayos independientes realizados por triplicado. Test de Student: * $p < 0,01$

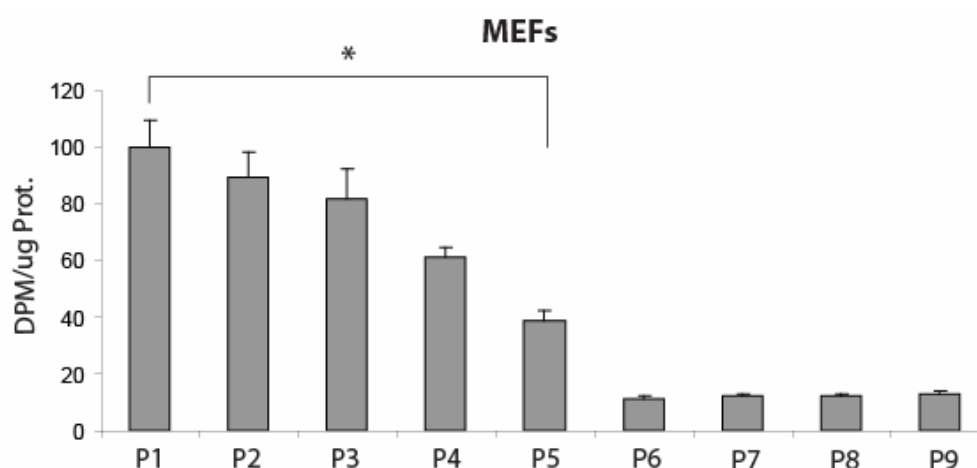


Fig. 2: Cese de incorporación de 3H timidina, en MEFs a lo largo de los distintos pasajes en cultivo. En cada pasaje se tomaron muestras, las cuales fueron incubadas con $1 \mu\text{Ci/ml}$ $[^3H]$ -timidina durante 6 horas a 37°C . Las células fueron lisadas y la incorporación de $[^3H]$ -timidina al DNA fue estimada como dpm/ μg de proteína. Las barras representan la media \pm D.E. de dos ensayos independientes realizados por cuadruplicado. Test de Student: * $p < 0,005$

1.2 Interrupción de la proliferación celular

Para confirmar mediante la utilización de otra técnica el resultado obtenido en el punto anterior, se analizó la detención de la proliferación celular en ambos modelos. Las células fueron fijadas y teñidas con cristal violeta. Este colorante tiene la capacidad de penetrar en los núcleos celulares de manera que puede establecerse una relación directa, entre el número de células viables y la cantidad de cristal violeta fijado.

Para el modelo de senescencia por estrés genotóxico fibroblastos humanos (WI-38) fueron tratados o no por 24 h con CPT 20 nM. Luego del tratamiento, las células fueron incubadas en medio de cultivo normal extrayéndose muestras durante 8 días. Cuando las células fueron tratadas con CPT se observó una disminución en la proliferación, sin cambios significativos en el número de células del cual se partió, sugiriendo un arresto irreversible ya que el seguimiento fue realizado por 8 días. Sin embargo, las células no tratadas continuaron creciendo normalmente.

En el modelo de senescencia fisiológica se extrajeron muestras a las 24 y 72 h post plaqueo en cada pasaje de MEFs. Se tomó como medida relativa de crecimiento la relación entre ambos intervalos de tiempo y, de esta manera, se tuvo en cuenta siempre el número inicial de células. A partir de este abordaje se observó una disminución en la proliferación en relación al número de pasaje.

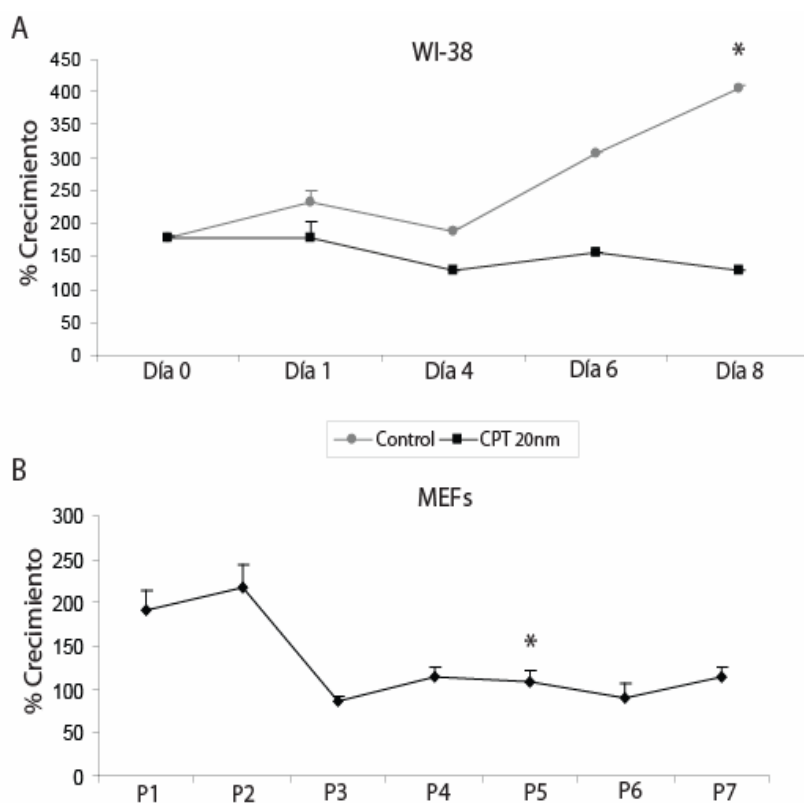


Fig. 3: Ensayos de cese de proliferación por recuento de células, (A) Fibroblastos humanos (WI-38) fueron plaqueados a una densidad de 20000 cel/well y tratados con CPT 20 nM por 24 h., luego colocados en medio normal durante 8 días para permitir su recuperación. El día 0, en las células tratadas con CPT, corresponde a la muestra tomada 24 hs post tratamiento, el día 1 es la muestra que después del tratamiento que tuvo 24 h. de recuperación en medio normal. Los valores fueron relativizados a la muestra tomada 24 hs posterior al plaqueo de las células cuyo valor fue 0.18 y considerado el 100%. (B) senescencia fisiológica, se obtuvieron muestras a las 24 y 72 h. post plaqueo en cada pasaje de MEFs, todas las muestras fueron relativizadas al pasaje 1 (P1) el cual fue considerado el 100%. Los puntos representan la media \pm D.E. de dos ensayos independientes realizados por sextuplicado. Test de Student: * $p < 0,005$

1.3 Actividad β -galactosidasa positiva y cambios en la morfología celular

También se analizó la actividad β -galactosidasa positiva a pH 6 que poseen las células senescentes la cual se denomina actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (Senescence Associated β galactosidase, SA- β -gal) (Dimri et al., 1995). Si bien, la falta de replicación es un marcador elemental, éste no permite distinguir entre células senescentes de aquellas que se encuentran en estado de quiescencia o totalmente diferenciadas. Este fue el primer marcador en ser identificado y es considerado uno de los más específicos, se utiliza tanto *in vivo* como *in vitro*. Esta SA- β gal es detectada por tinción citohistoquímica y se cree que es consecuencia del aumento en el contenido lisosomal que poseen las células senescentes (Lee et al., 2006).

Dicha actividad (SA- β -Gal) fue analizada en células WI-38 incubadas o no con CPT (Fig. 4) y en MEFs de pasaje bajo y alto (Fig. 5). Se observó un aumento notable de la SA- β -Gal en respuesta al tratamiento con CPT (senescencia genotóxica) y en MEFs de pasaje alto (senescencia fisiológica).

También se observó, en ambos modelos, cambios en el fenotipo celular. Tanto en las células tratadas con CPT como en MEFs de pasaje alto, se advirtió la morfología aplanada y alargada que poseen las células en estado de senescencia (Fig. 6).

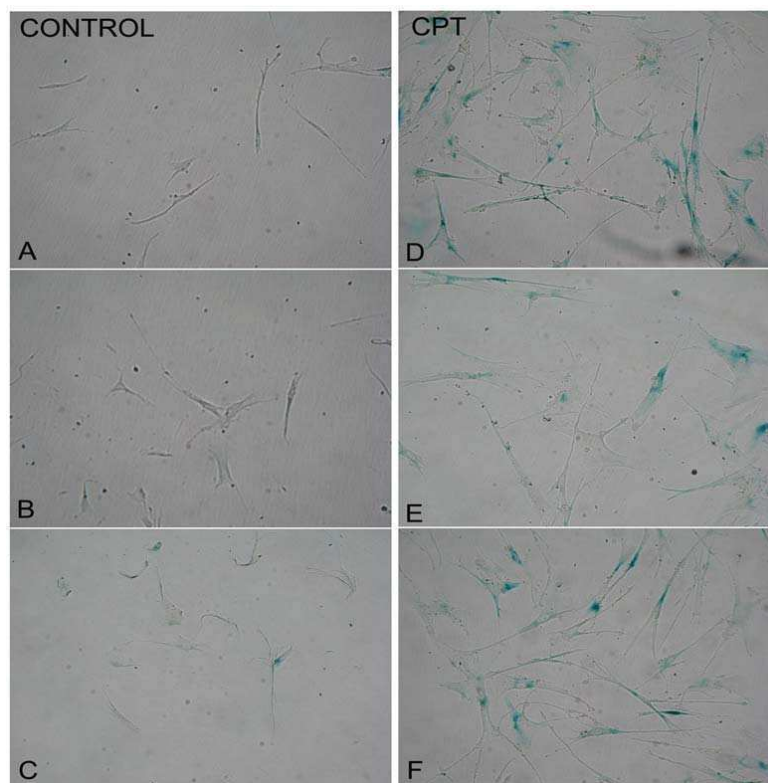


Fig. 4: SA- β -Gal positiva, Células WI-38 control (A, B, C) o tratadas por 72 hs con CPT (D, E, F). Las células fueron fijadas e incubadas por 16 h. con la solución de tinción que posee el sustrato cromogénico X-GAL. Pasadas las 16 h, las células fueron lavadas con PBS y observadas en el microscopio invertido IX70 Olympus Fluoview con un aumento de 400X.

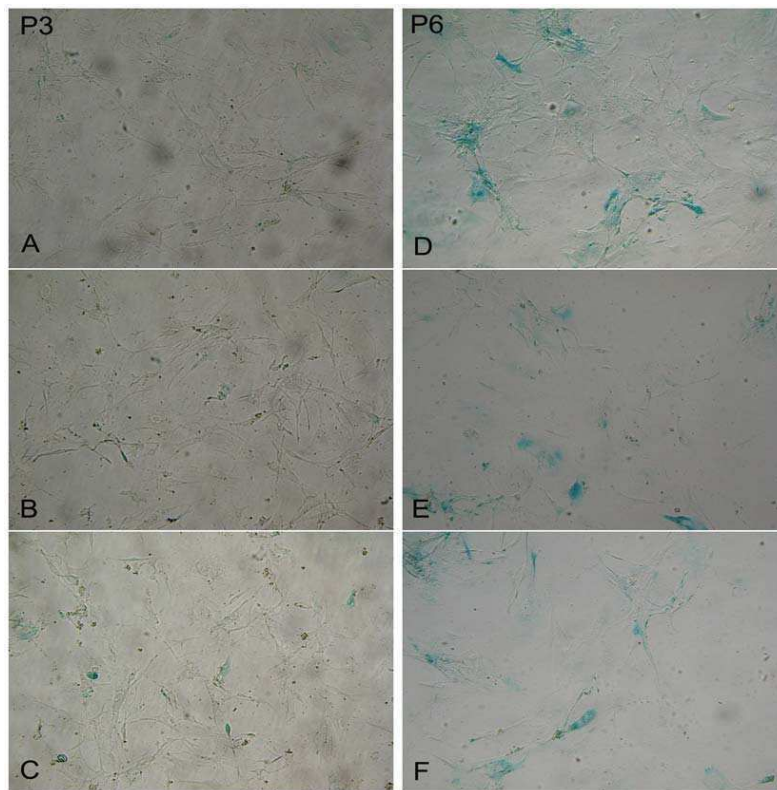


Fig. 5: SA- β -Gal positiva, en MEFs de pasaje bajo, P3, (A, B, C) y pasaje alto, P6, (D, E, F) Las células fueron fijadas e incubadas por 16 h. con la solución de tinción que posee el sustrato cromogénico X-GAL. Pasadas las 16 h, las células fueron lavadas con PBS 1X y observadas en el microscopio invertido IX70 Olympus Fluoview con un aumento de 400X.

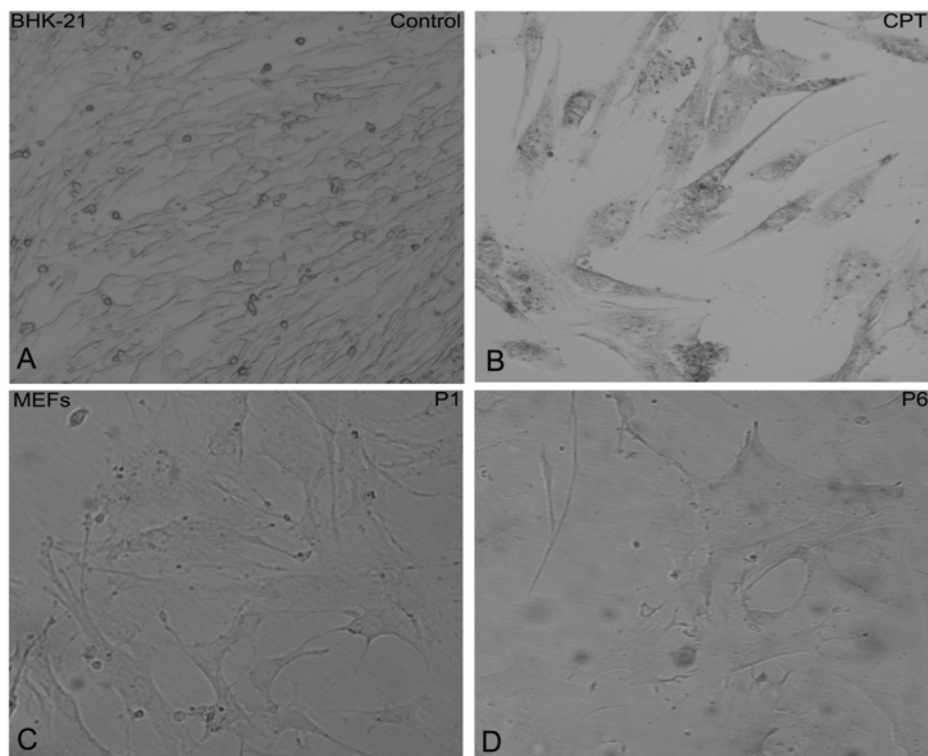


Fig. 6: (A y B), Celulas BHK-21 control y tratadas por 72 con CPT. (C y D) MEFs de pasaje bajo (P3) y pasaje alto (P6). Las células fueron fijadas y observadas en el microscopio invertido IX70 Olympus Fluoview con un aumento de 400X.

1.4 Formación de SAHF (senescence associated heterochromatin foci)

Como último marcador de senescencia se analizó la formación de *foci* de heterocromatina. Cuando células senescentes son teñidas con DAPI se observan *foci* esparcidos en el núcleo, los cuales corresponden a cromatina altamente compactada. Por el contrario, los núcleos de células no senescentes muestran un patrón de tinción uniforme. Se demostró por inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) que los promotores de los genes target de E2F, involucrados en la progresión del ciclo celular, se vuelven heterocromáticos de manera simultánea a la aparición de SAHF en células senescentes (Narita et al., 2003). Estas evidencias permiten sostener que dichas alteraciones en la estructura de la cromatina contribuyen a la irreversibilidad del proceso de senescencia (Braig and Schmitt, 2006; Narita et al., 2003). Además, se vio que estos *foci* contienen numerosas proteínas que están presentes en la heterocromatina transcripcionalmente inactiva incluyendo histonas hipoacetiladas, histona H3 metilada en lisina 9 (H3K9me) y HP1 (heterochromatin protein, α HP1, β HP1 y γ HP1) (Decottignies and d'Adda di Fagagna, 2011; Di Micco et al., 2007).

En ambos modelos se analizó la presencia de SAHF. Previo a la tinción con DAPI se realizó una inmunocitoquímica para detectar la presencia de γ HP1, dado que esta proteína es reclutada en los SAHF y es la única, de los miembros de su familia, que se fosforila en senescencia. Esta modificación es necesaria para su unión a los SAHF (Zhang et al., 2007).

Tanto para el modelo de senescencia genotóxica como para senescencia fisiológica se observó la aparición de SAHF. En la fig. 7 se observa el patrón de tinción uniforme tanto con DAPI como para la proteína γ HP1 en las células control. Por el contrario, cuando las células fueron tratadas con CPT se observa la aparición de pequeños SAHF. Por otro lado, en la fig. 8, se observan pequeños *foci* en MEFs de pasaje bajo. Esto es debido a que las células de ratón poseen cromatina pericentromérica mucho más prominente que las células humanas. La misma también tiene afinidad preferencial por el DAPI y las proteínas que forman los SAHF, sin embargo no hay evidencia de que estos *foci* contengan los promotores de los genes blanco de E2F como los SAHF en senescencia (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007; Cerda et al., 1999). En MEFs de pasaje alto (P6) se observa que los SAHF aumentan en número, tamaño e intensidad.

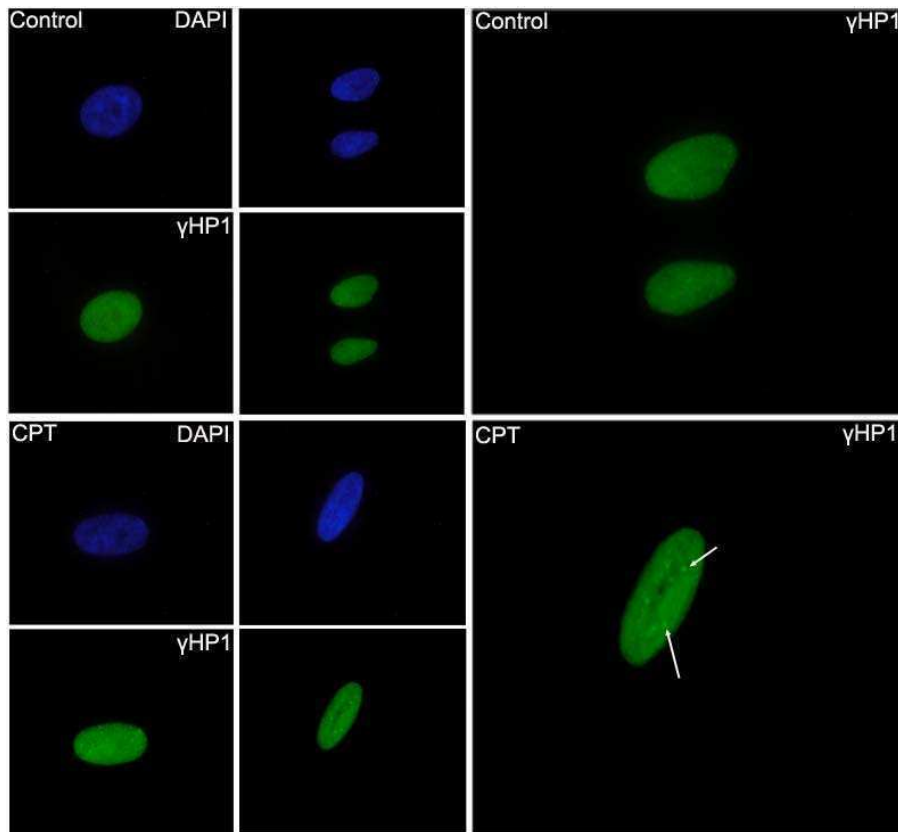


Fig. 7: Detección de SAHF: Células WI-38, control (panel superior) o tratadas con CPT 20 nM por 72 h. (panel inferior). Se determinó la expresión de γ HP1, en color verde y en azul se observa la tinción con DAPI. El anticuerpo secundario fluorescente utilizado fue alexa 488 (verde). Las imágenes fueron obtenidas con un aumento de 1000X.

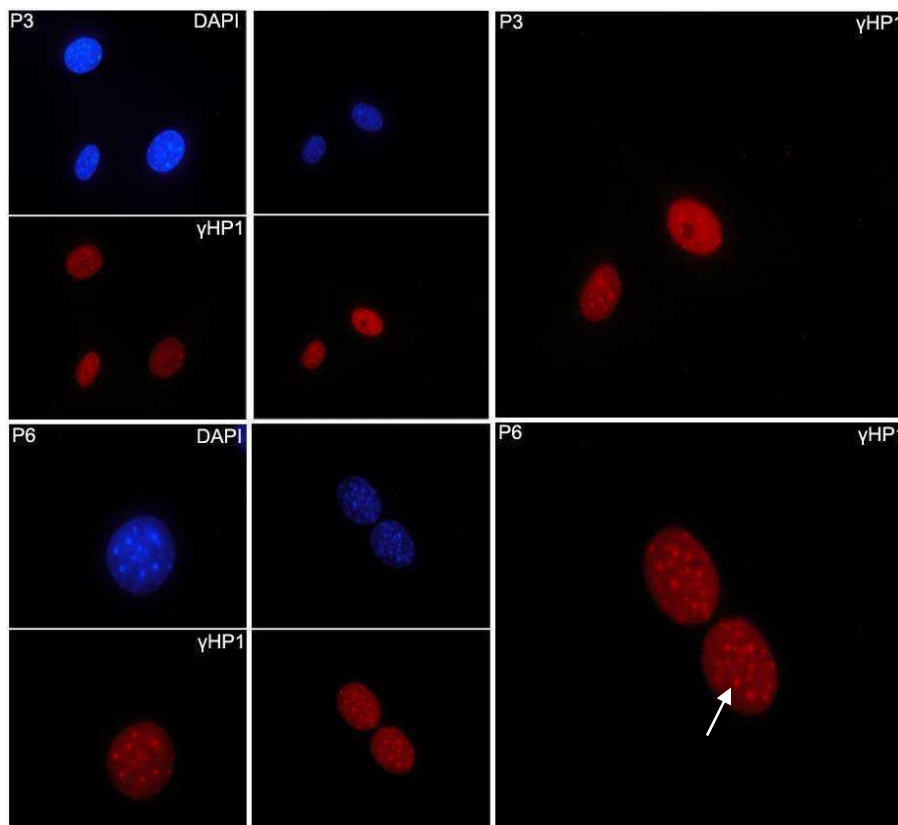


Fig. 8: Detección de SAHF: Células MEFs pasaje bajo (panel superior) o pasaje alto (panel inferior), Se determinó la expresión de γ HP1, en color rojo y en azul se observa la tinción con DAPI. El anticuerpo secundario fluorescente utilizado fue alexa 594 (rojo). Las imágenes fueron obtenidas con un aumento de 1000X.

2. Expresión de p19 en respuesta a senescencia

Una vez comprobados nuestros modelos se procedió a verificar si la expresión de p19 se ve afectada en respuesta a los dos tipos de senescencia estudiados.

2.1 p19 se induce tempranamente en senescencia genotóxica

Para comprobar si p19 se induce en respuesta al tratamiento con CPT se realizaron curvas de dosis y tiempo analizándose la expresión de p19 por northern y western blot. Se comprobó que p19 aumenta frente al tratamiento con CPT (20 nM) y que este incremento es dosis dependiente. La inducción del mRNA de p19 comenzó a las 12 h de tratamiento y se mantuvo elevada hasta al menos las 72 h posteriores al agregado de CPT, tiempo en el cual ya se detectaron todos los marcadores de senescencia. A su vez, se vio que la mínima concentración de CPT necesaria para el aumento de p19 fue 20 nM (Fig. 9 A y B). Cuando se analizaron los niveles proteicos de p19 se observó que la inducción comenzó a las 12 h de tratamiento manteniéndose elevada aún a las 72 h (Fig. 10).

Luego se analizó la expresión de otros miembros de la familia de inhibidores de CDKs (CKIs). Se observó que la expresión de p16 y p21, que representan biomarcadores definidos de senescencia, es inducida a las 12 h luego del tratamiento con CPT (Fig. 9). Es importante remarcar que el inicio de la inducción de estos 2 genes se corresponde temporalmente con el de p19. Esto indica que p19 se induce tempranamente en respuesta a un estímulo que dispara la senescencia genotóxica. Por otro lado, los niveles de p19, al igual que los de p16 y p21, se mantienen elevados al menos hasta las 72 horas. Esto sugiere que p19 podría participar en el establecimiento y el mantenimiento del estado senescente.

Para evaluar si la inducción de p19 está limitada al tipo celular empleado o es un fenómeno más general, se realizaron experimentos similares en otras líneas celulares, BHK-21 y HEK293, y en MEFs. En todos ellos se observa un aumento de p19 a las 12 h, aproximadamente, luego del tratamiento con CPT (Fig. 11).

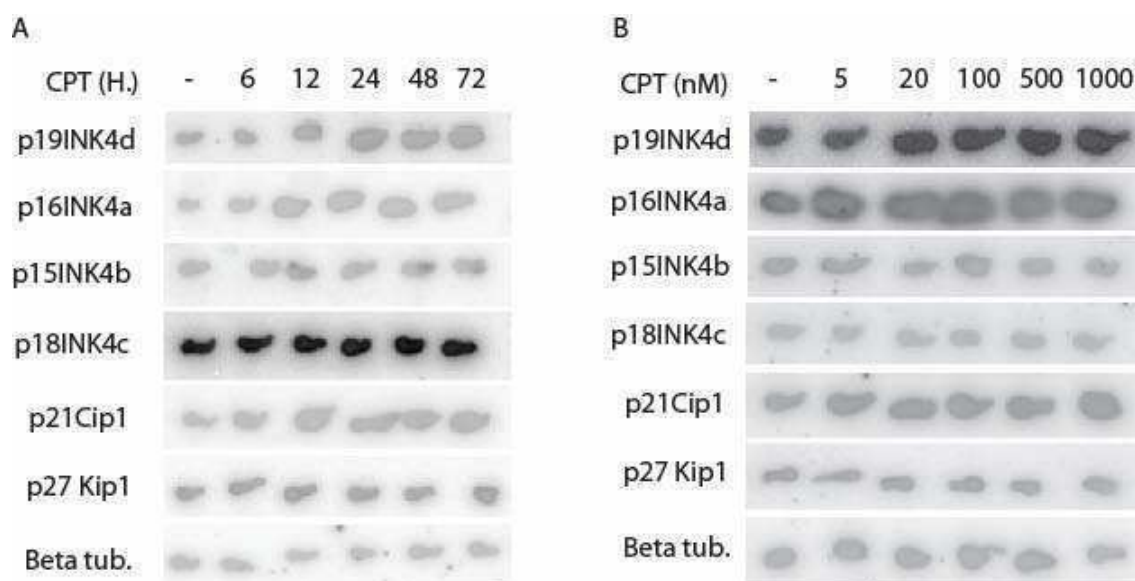


Fig. 9: A *Curva de tiempo del genotóxico*, Células WI-38 fueron tratadas por 6, 12, 24, 48, y 72 h. con CPT 20nM. B *Curva de dosis del genotóxico*, Células WI-38 tratadas a diferentes concentraciones del dañador (CPT). En ambos casos se extrajo el ARN total y por northern blot se analizó la expresión del mRNA p19 y los demás miembros de la familia de CKI (p15, p16, p18, p21 y p27) Beta tubulina fue utilizada como control de carga.

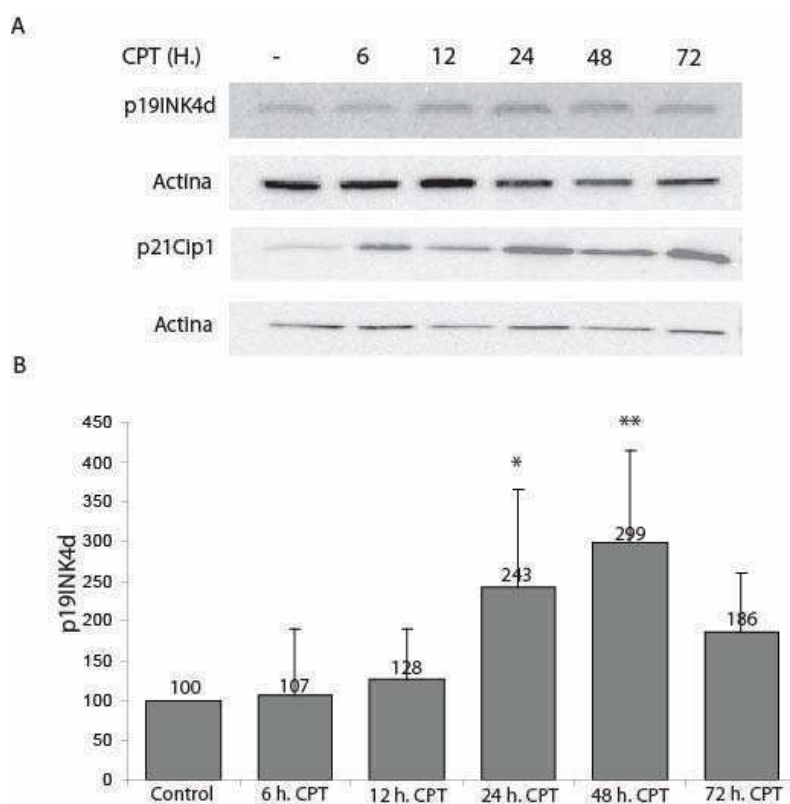


Fig. 10: A *Curva de tiempo del genotóxico*, Células WI-38 fueron tratadas a diferentes tiempos con CPT 20 nM. Se realizó la extracción de proteínas totales y se analizó, por western blot, la expresión de p19 y p21. Actina fue utilizada como control de carga. B Cuantificación de la expresión de p19, los valores fueron relativizados a la muestra control, la cual fue considerada el 100%. Las barras representan la media \pm D.E. de cuatro ensayos independientes. Test de Student: * $p < 0,1$ ** $p < 0,05$

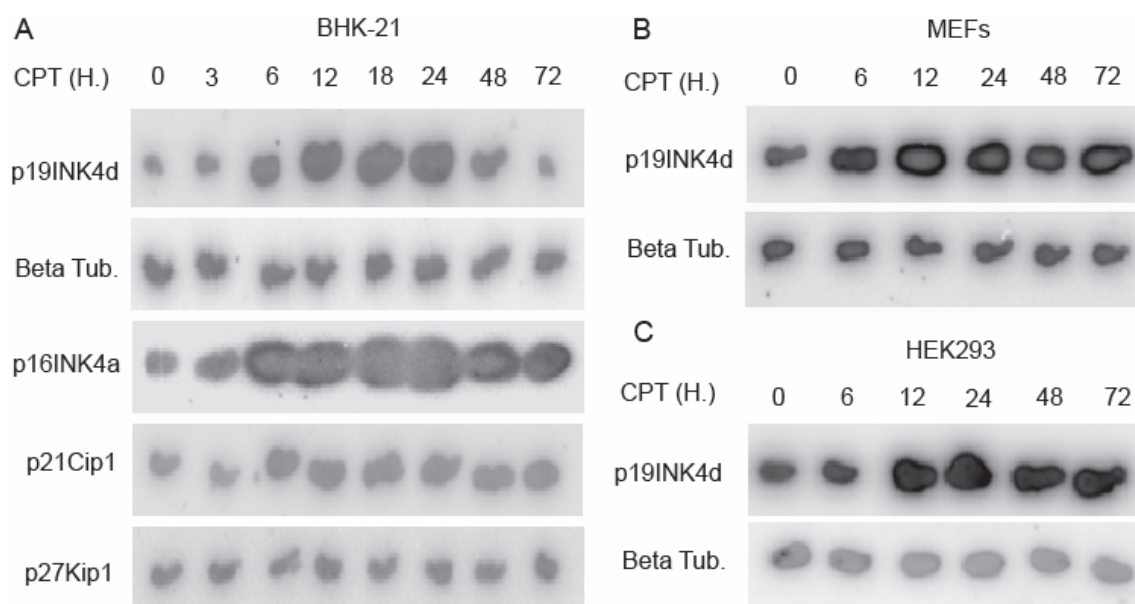


Fig. 11: (A) Curva de tiempo realizada en células BHK-21. (B) en MEFs (C) en HEK293. Las células fueron tratadas con CPT 20 nM a distintos tiempos según se indica en cada figura. En todos los casos se extrajo el ARN total y por northern blot se analizó la expresión del mRNA p19 y los demás miembros de la familia de CKI (p15, p16, p18, p21 y p27) Beta tubulina fue utilizada como control de carga.

2.2 Inducción de p19 en senescencia replicativa

Posteriormente, se analizó la expresión de p19 en senescencia fisiológica. Para ello se utilizaron MEFs y se tomaron muestras de cada pasaje para analizar los niveles de mRNA y proteína de p19.

Se observó un aumento del transcripto de p19 a partir del pasaje 5 que se mantuvo hasta el pasaje 8, el último analizado (Fig. 12 A y B). Al igual que en la senescencia genotóxica, la inducción de la expresión de p19 coincidió con el aumento de expresión de p16 y p21, reforzando la hipótesis expuesta más arriba acerca del papel de p19 en el establecimiento y mantenimiento de la senescencia (Fig. 12 A y B). Respecto a la expresión de la proteína p19, se analizó en distintos pasajes de MEFs y en un cultivo primario de fibroblastos dérmicos humanos (éstos últimos cedidos gentilmente por la Dra. María E. Scassa, FLENI). En ambos casos se observó la inducción de la proteína p19 en los pasajes 6 y 4 respectivamente (Fig.12 C y D).

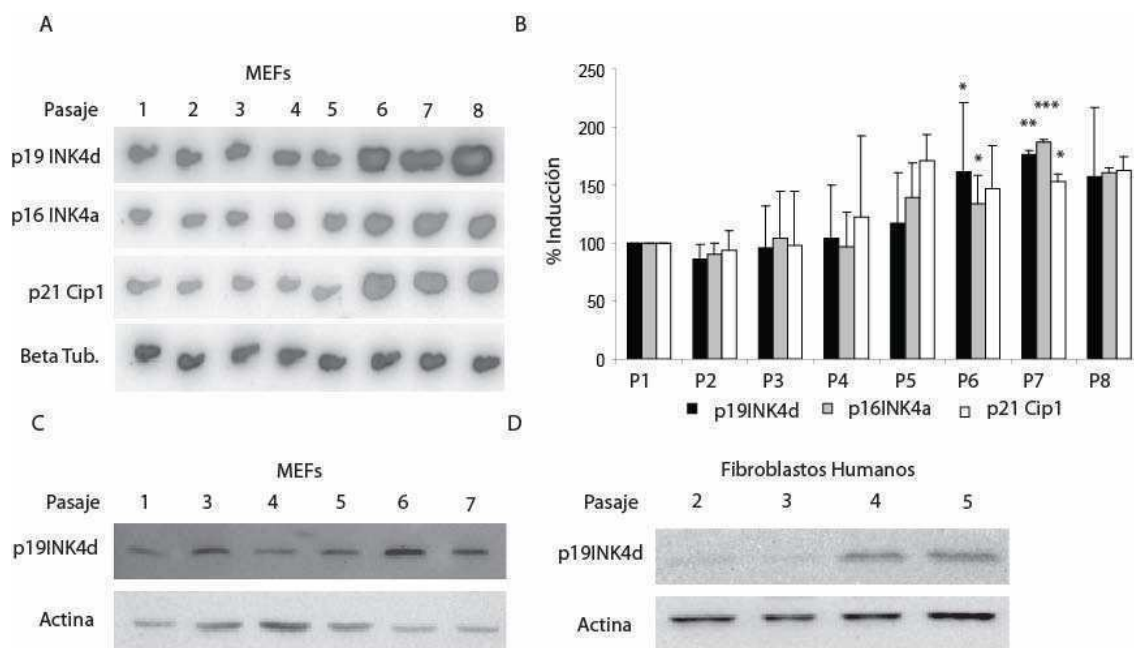


Fig. 12: *Senescencia fisiológica*, (A y B) northern blot y su correspondiente cuantificación realizado en MEFs a lo largo de los sucesivos pasajes en cultivo. Se extrajo el ARN total y por northern blot se analizaron los niveles de mRNA de p19, p21 y p16. Beta tubulina fue utilizado como control de carga. Los valores fueron relativizados a la muestra control la cual fue considerada el 100%. Las barras representan la media \pm D.E. de tres ensayos independientes. Test de Student: * $p < 0,1$ ** $p < 0,05$, *** $p < 0,005$. Western blot realizado en MEFs (C) y fibroblastos humanos (D) a los largo de los sucesivos pasajes en cultivo, se realizó la extracción de proteínas totales y por western se observó la expresión de p19. Los niveles de expresión de actina se utilizaron como control de carga.

En conjunto estos resultados demuestran que, en ambos tipos de senescencia, fisiológica y genotóxica, se induce la expresión de p19, tanto el mRNA como la proteína. Esta inducción coincide, temporalmente, con la de dos proteínas involucradas en el establecimiento de la senescencia como p16 y p21. Además la inducción de p19 concuerda con la aparición de los distintos marcadores de senescencia en ambos modelos.

3. Diferencias en la activación de p19 según la dosis de genotóxico empleada

En nuestro laboratorio hemos demostrado que p19 se induce en respuesta a diferentes genotóxicos y que esto incrementa la reparación del ADN dañado en diversos tipos celulares (Ceruti et al., 2005; Ceruti et al., 2009; Scassa et al., 2007). Nos preguntamos, entonces, si la inducción de p19 en respuesta al estímulo de senescencia genotóxica está relacionada con su función en la reparación del ADN. Para ello, células WI-38 fueron

expuestas a distintas condiciones de estrés genotóxico, una de estímulo senescente y otra de daño al ADN. Se las incubó por 24 h con CPT 20 nM (condición de senescencia) y CPT 1 μ M (condición de daño y reparación) y, posteriormente, se las colocó en medio basal para permitir su recuperación durante 6 días. De manera que, si la inducción de p19 en senescencia genotóxica estuviera relacionada con su función de reparación, deberíamos ver un aumento en la expresión cuando las células son tratadas con el dañador, seguido de una disminución una vez recuperadas las células en medio normal.

Se analizaron los cambios en la expresión de p19 y en la proliferación celular. Como se observa en la fig. 13 B, el transcripto de p19 se induce y se mantiene en niveles elevados durante los 6 días en que las células fueron mantenidas en medio normal posterior al tratamiento con CPT 20 nM. Por el contrario, la inducción de p19 observada con el tratamiento con CPT 1 μ M es transitoria. Ésta disminuye a partir del 4 día de recuperación manteniéndose en sus valores basales hasta el día 6. Los resultados obtenidos en la determinación de la proliferación celular son indicadores de la estimulación de dos procesos diferentes (Fig. 13D). Con la baja dosis del genotóxico no se observan cambios significativos en el número de células, sugiriendo un arresto del ciclo celular compatible con el estado de senescencia. Con respecto al tratamiento con altas dosis de genotóxico se destaca una disminución en el número de células, probablemente causada por apoptosis en respuesta al tratamiento que resultó en un daño al ADN.

Estos resultados indican que la inducción de p19 en respuesta al estímulo genotóxico que dispara la senescencia presenta características distintas a la inducción por un estímulo que causa daño al DNA y apoptosis.

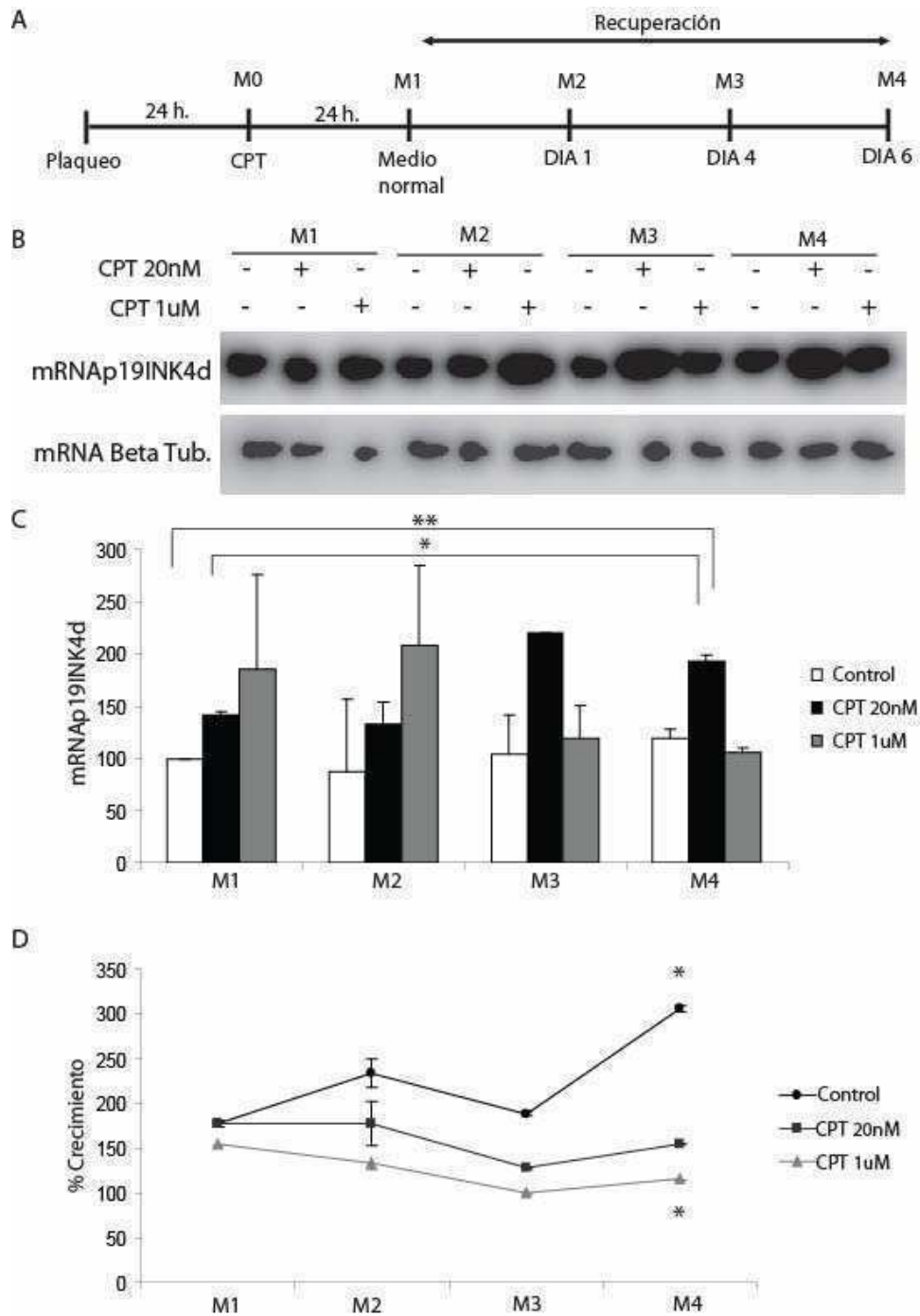


Fig. 13: (A) Esquema representativo que muestra cómo fue realizado el experimento. Células Wi-38 fueron plaqueadas y 24 h. después se tomó la muestra (M0), luego fueron incubadas con CPT 20 nM y 1 uM (condición de senescencia y altas dosis de daño respectivamente). 24 h. post- tratamiento se tomaron las muestras (M1) de cada condición (control, CPT 20 nM y CPT 1 uM), después se permitió la recuperación en medio normal durante seis días, obteniéndose muestras al día 1 (M2), día 4 (M3) y día 6 (M4). (B) Se extrajo el ARN total de cada muestra (M1, M2, M3 y M4) y por northern blot se analizó la expresión de p19 en cada condición (control, CPT 20 nM y CPT 1 uM). (C) Cuantificación realizada a partir del northern blot, los valores fueron relativizados a la muestra M1 control, las barras representan la media \pm D.E. de dos ensayos independientes. Test de Student: ** $p < 0,05$, * $p < 0,1$ (D) Ensayo de cese de proliferación por recuento de células, utilizando los mismos tratamientos anteriormente nombrados, los valores fueron relativizados a la muestra M0 la cual fue considerada el 100%. Los puntos representan la media \pm D.E. de dos ensayos independientes realizados por sextuplicado. Test de Student: * $p < 0,005$

4. ¿En que fase del ciclo celular se produce el arresto?

Nuestro siguiente objetivo consistió en analizar en que fase del ciclo celular se produce el arresto, dado que las células senescentes están arrestadas con un contenido de ADN que corresponde a la fase G1 o G2 dependiendo del tipo celular y el estímulo de origen (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Además p19 es una proteína que se expresa diferencialmente en las distintas fases del ciclo, presentando su pico de expresión entre las fases G1 medio y S y desapareciendo en G2.

Para analizar este punto, células WI-38 fueron inducidas a entrar en senescencia genotóxica con CPT 20 nM y los MEFS en senescencia fisiológica. En células WI-38 también se utilizó una concentración de CPT (1 μ M) capaz de dañar extensamente al DNA y generar apoptosis. Las muestras fueron fijadas e incubadas con yoduro de propidio para su posterior análisis por FACS.

Tal como se observa en la Fig. 13 C y D, en senescencia fisiológica el arresto se produce en la fase G2 del ciclo. Al comparar pasaje bajo vs. alto se observó un aumento de células en fase G2 en detrimento de G1. También se observó un pequeño porcentaje de células en fase subG1. Dado que en el ciclo celular normal la expresión de p19 es nula en la fase G2, este resultado nos está indicando que, en este tipo de senescencia, se manifiesta un mecanismo de inducción activa de p19 que sería causa o consecuencia del estado senescente.

En cuanto a senescencia por estrés genotóxico (CPT 20 nM) se observa un aumento en el número de células en fase S lo cual concuerda con la acción ejercida por el dañador. CPT inhibe la topoisomerasa I provocando el atascamiento de la horquilla de replicación y el arresto del ciclo celular en la fase de duplicación del ADN (Mullany et al., 1998; Nelson and Kastan, 1994).

Cuando se utiliza una concentración de CPT capaz de dañar extensamente al DNA y generar apoptosis, se observa un porcentaje mayor de células en las fases subG1 y G2, con la consecuente disminución en G1. Este resultado concuerda con lo observado en la sección anterior, en la cual se vio la disminución del número de células cuando fueron tratadas con CPT 1 μ M. Dicha disminución es probablemente causada por apoptosis dado el aumento observado en la fase subG1 del ciclo celular.

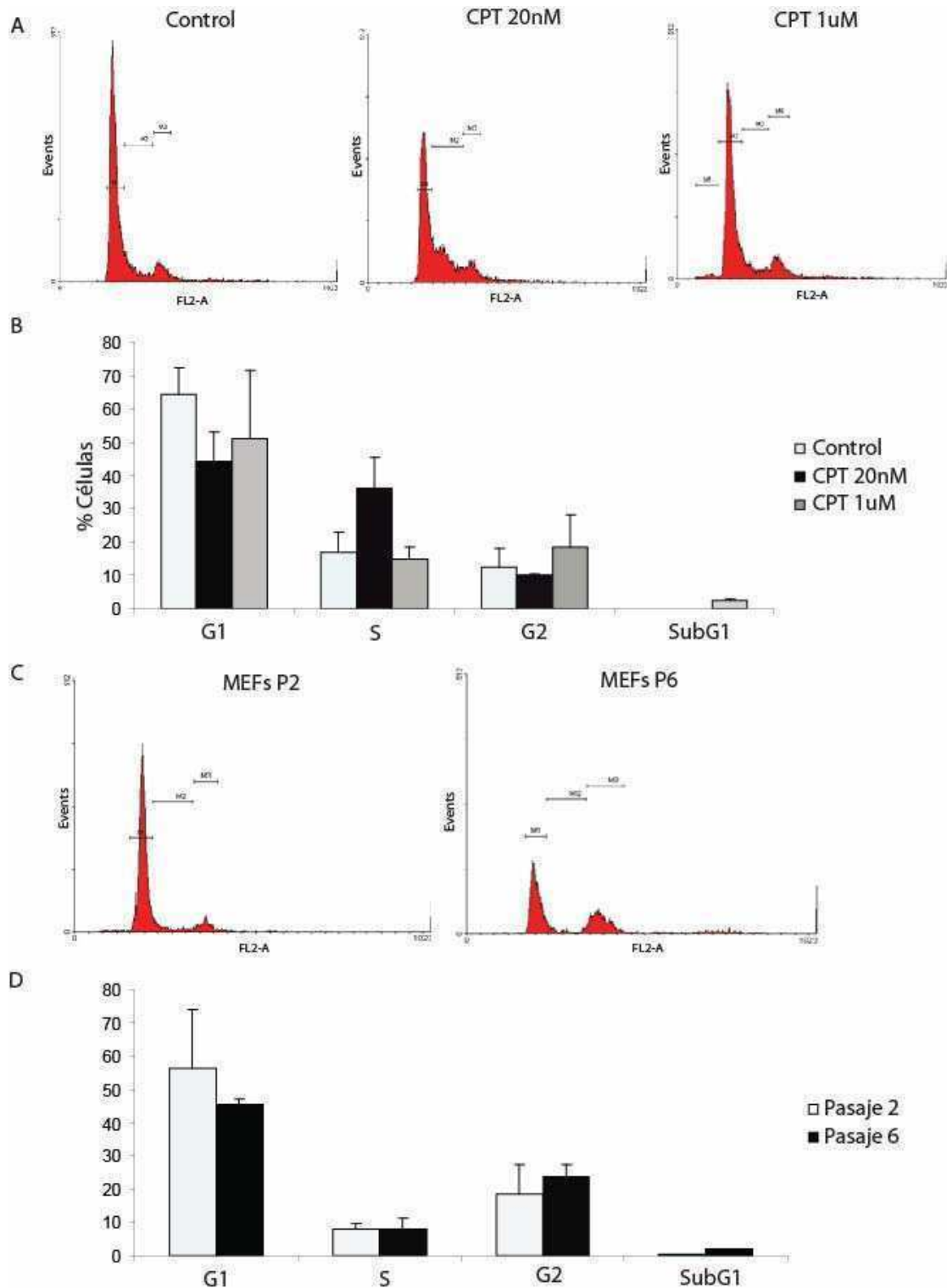


Fig. 14: (A y B) Perfiles de FACS obtenidos a partir de células WI-38 control y tratadas con distintas dosis del dañador (20nM y 1uM) por 24 h. (C y D) Resultados de facs obtenidos a partir de Mefs de pasaje bajo y alto. Las células fueron cosechadas y fijadas en etanol 70%, luego incubadas con yoduro de propidio para el análisis del contenido de ADN. (B y D) Cuantificación de cada una de las fases en cada condición mediante la utilización del programa WinMDI 2.8.

5. Cambios en la expresión de p19 modulan el programa senescente

Nuestro siguiente objetivo consistió en analizar si la inducción de la expresión de p19 durante ambos tipos de senescencia posee algún significado fisiológico. Si este fuera el caso, la modulación de los niveles de p19 debería causar alguna alteración en el establecimiento de estos tipos de senescencia.

Para poder analizar si existe una relación directa entre la inducción de p19 y el mecanismo de senescencia, se construyeron dos líneas celulares a partir de las células BHK-21. Estas construcciones tienen establemente transfectado el vector pMTC6+ en el cual se clonó el cDNA de p19 orientado de manera directa (p19 sense) o invertida (p19 antisense) bajo el control del promotor de metalotioneína inducible por Zn^{2+} . De este modo el agregado de Zn^{2+} conducirá a la expresión aumentada o disminuida de p19, respectivamente. En este modelo se midieron distintos marcadores de senescencia inducida por estrés genotóxico (CPT 20 nM).

5.1 Arresto del ciclo

Para confirmar si se afecta el arresto del ciclo en respuesta al tratamiento con CPT, según se encuentren aumentados o disminuidos los niveles de p19, se realizaron ensayos de incorporación de [3H]-timidina. Se comprobó que los clones BHK p19AS arrestan el ciclo de manera tardía en comparación a los clones WT y clones p19S. Esto sugiere un posible rol de p19 en el arresto irreversible de este proceso (Fig. 15A).

En las Figuras 15 B y C se observa el control de los respectivos clones realizado tanto por northern como por western blot.

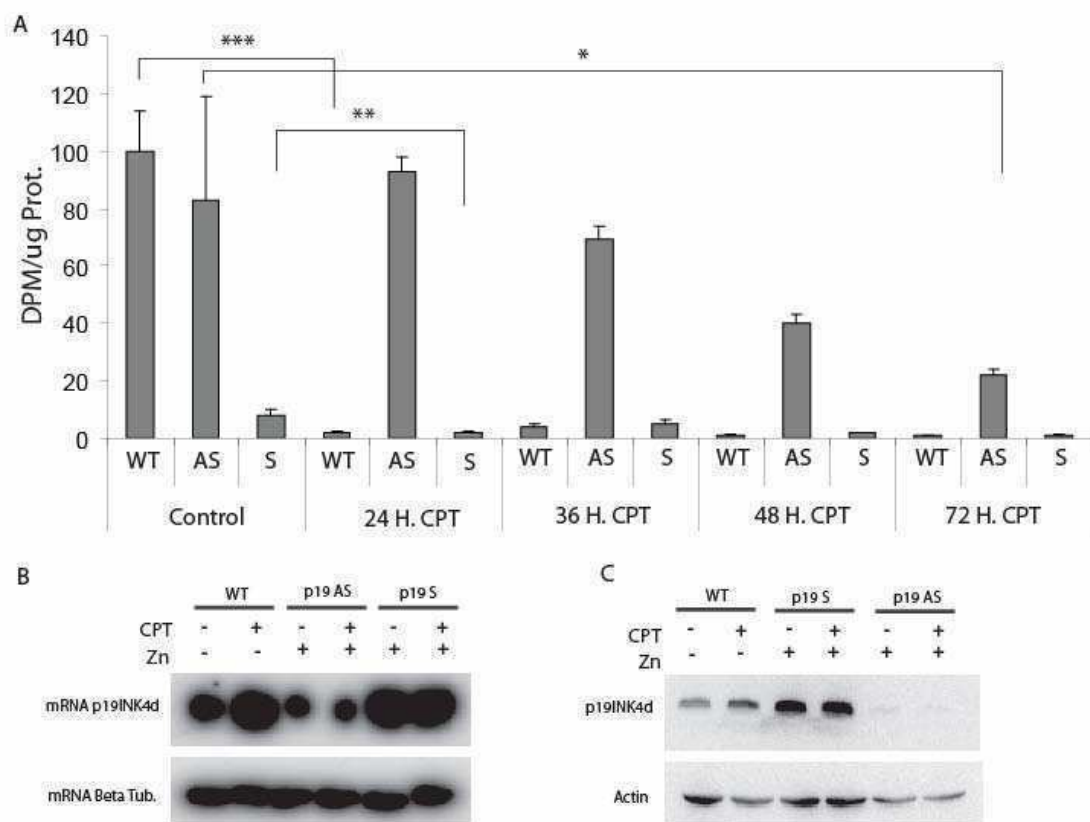


Fig. 15: (A) Incorporación de timidina [^3H] en células BHK21 que tienen aumentada (sense S) o disminuida (antisense AS) la expresión de p19. Los clones WT, S y AS fueron tratadas con CPT 20nM por 24, 36, 48 y 72 h. Previo al tratamiento con CPT a cada clon se le agregó SO_4Zn (50 μM) para activar el promotor de metalotioneína. Luego del tratamiento fueron incubadas con 1 $\mu\text{Ci/ml}$ [^3H]-timidina durante 6 horas a 37 $^\circ\text{C}$. Posteriormente fueron lisadas y la incorporación de [^3H]-timidina al DNA fue estimada como dpm/ μg de proteína. Las barras representan la media \pm D.E. de dos ensayos independientes realizados por triplicado Test de Student: *** $p < 0,005$, ** $p < 0,05$, $p < 0,1$ (B) Control de cada clon por northern y (C) western blot.

5.2 Actividad β -galactosidasa positiva

Además de analizar el arresto del ciclo, también se estudió la SA- β Gal+ en los diferentes clones tratados o no con CPT por 72 h. Dicha actividad fue detectada y cuantificada en clones de células BHK-21 WT, p19 sense (S) y antisense (AS). También se utilizaron, como control positivo, células que sobreexpresan p21. Los clones p21S fueron obtenidos con el mismo procedimiento anteriormente descrito para p19.

Se observó que la SA- β -Gal+ se encuentra aumentada en clones que sobreexpresan 19 (p19S) en comparación con los clones WT (Fig. 16). Por el contrario, cuando la expresión de p19 se encuentra disminuida (p19AS) la SA- β -Gal+ se vio reducida en comparación a los clones WT. En los clones p21S, como se esperaba, se observó un incremento en la SA- β -Gal+ dado que p21 esta involucrada en el establecimiento de la senescencia. Es importante destacar que el aumento en la SA- β -Gal+ observado para los

clones p19S es similar al de los clones p21S. Esto refuerza aún mas la hipótesis expuesta más arriba acerca del papel de p19 en el establecimiento y mantenimiento de la senescencia.

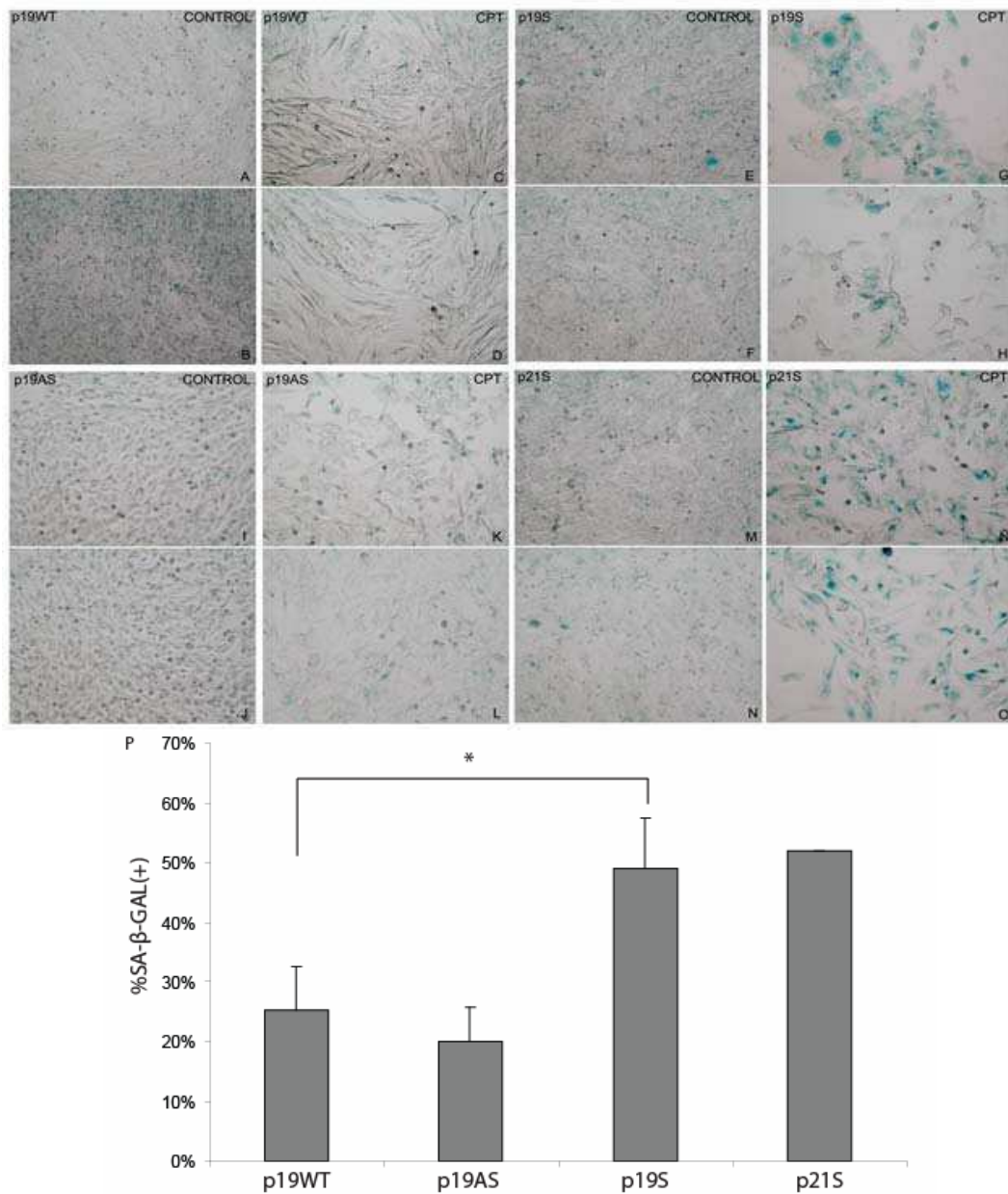


Fig. 16: Visualización y cuantificación de SA-βgal, realizada en cada clon de células BHK-21 tratadas por 72 hs. con CPT 20 nM, A-D) clones WT, E-H) Clones p19 S, I-L) clones p19 AS, M-O) clones p21S. Previo al tratamiento con CPT a cada clon se le agregó SO4Zn (75uM) para activar el promotor de metalotioneína Las células fueron fijadas e incubadas por 16 h. con la solución de tinción que posee el sustrato cromogénico X-GAL. Pasadas las 16 h, las células fueron lavadas con PBS 1X y observadas en el microscopio con un aumento de 400X. (P) cuantificación de SA-βgal+ las barras representan la media \pm D.E. de dos ensayos independientes. Test de Student: * p < 0,15

Los resultados obtenidos sugieren que hay una relación directa entre la inducción de p19 y el establecimiento de la senescencia, dado que modulando los niveles de p19 se observó una alteración en el arresto del ciclo y en la SA-β-Gal+, dos marcadores

fundamentales de senescencia, dándonos indicios de la relevancia que posee el aumento del transcripto y la proteína de p19 observados en este proceso.

6. La inducción de la expresión de p19 esta regulada a nivel transcripcional

En experimentos anteriores demostramos que en el estado de senescencia, tanto replicativa como genotóxica, hay un incremento en los niveles de mRNA de p19. Si bien esto puede indicar un aumento en la expresión del gen, también podría ser producto del aumento en la estabilidad de dicho mRNA. Con el objeto de analizar con mayor profundidad este punto, realizamos ensayos de “*nuclear run on*” para determinar la velocidad de inicio de la transcripción del gen de p19. Este ensayo fue realizado en células tratadas o no con CPT y en MEFs de pasaje bajo y alto.

A partir de estos resultados se confirmó que el número de iniciaciones de la transcripción del gen de p19 aumenta tanto en senescencia genotóxica como replicativa. Como genes controles, los cuales se sabe que aumentan su expresión en senescencia, se utilizaron NF-Y y p21 (Campisi, 2001; Matuoka and Chen, 2000; Noda et al., 1994). Para ambos genes se observó un aumento en la expresión, tanto en senescencia genotóxica como replicativa. Por el contrario, como control de genes que disminuyen su expresión en senescencia se utilizaron ciclina E y E2F1 (Kanazawa et al., 1994). La expresión de estos genes disminuyó en ambos tipos de senescencia. La sonda de beta tubulina fue utilizada como control de carga.

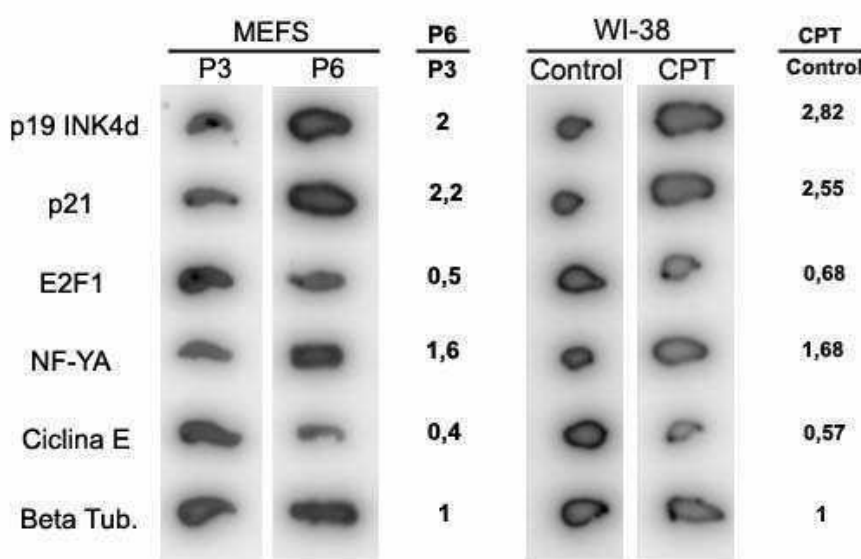


Fig. 17: *Nuclear Run On* realizado en células Wi-38 tratadas o no CPT y en MEFs de pasaje bajo (P3) y alto (P6). El RNA radiomarcado [^{32}P - α] UTP, fue extraído e hibridizado a una membrana de nylon que contenía las sondas de ADN desnaturalizadas de p19, p21, E2F1, NF-YA, Cyclina E y Beta tubulina. La tasa de inicio de transcripción fue normalizada a los valores de Beta tubulina en cada condición (Control vs CPT y P3 vs P6), los valores se observan a la derecha de cada foto.

6.1 La actividad del promotor de p19 aumenta en respuesta a la inducción del mecanismo de senescencia

Para confirmar los resultados obtenidos en los experimentos de *run on*, que indican que el aumento en la expresión de p19, en respuesta a senescencia genotóxica y replicativa, esta regulado a nivel transcripcional, realizamos ensayos de transfecciones transientes con un vector que posee un fragmento de 2250 pb correspondiente a la región 5' flanqueante del gen de p19, dirigiendo la expresión del gen reportero cloranfenicol acetiltransferasa (p19CAT). En la Fig. 18A se observa que, luego de 24 horas del tratamiento con CPT en células HEK293, hay un aumento en la actividad del promotor de 19 que se mantuvo hasta por lo menos 72 h posteriores al tratamiento. En el caso de la senescencia fisiológica se observó un aumento en la actividad del promotor a partir del pasaje 5 y el mismo se mantuvo hasta el pasaje 7, el último analizado (Fig. 18B). Con esta estrategia se pudo confirmar que ambos tipos de senescencia aumentan la expresión de p19 actuando directa o indirectamente sobre su promotor.

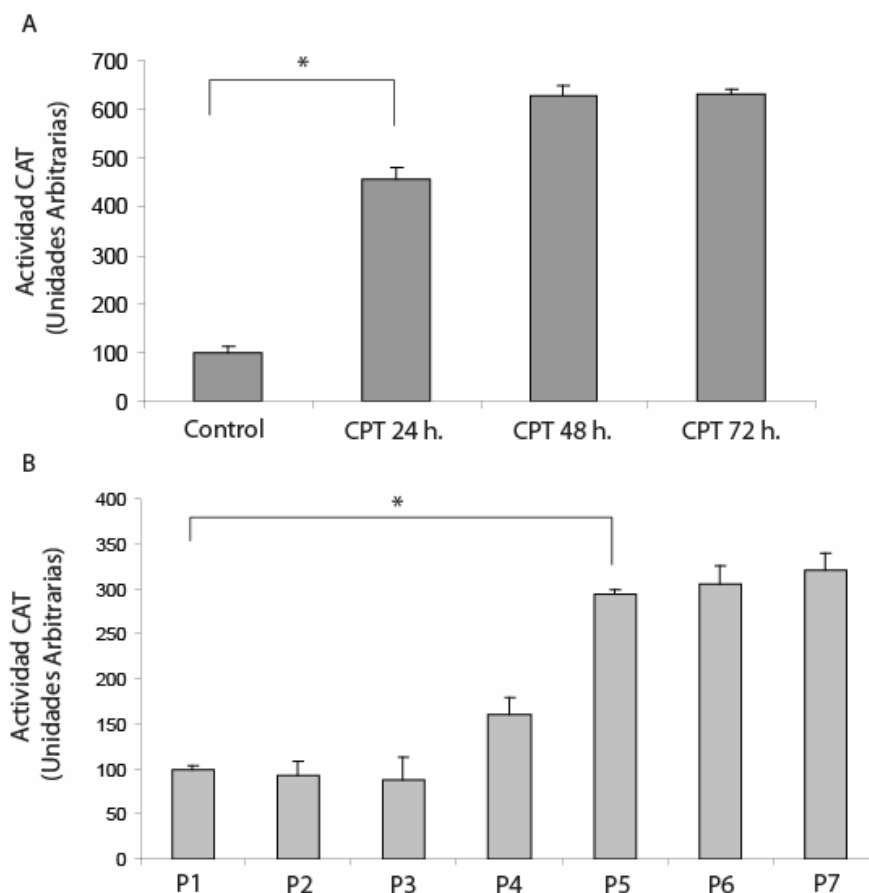


Fig. 18: *Actividad del promotor de p19*, (A) Células HEK 293, fueron transfectadas con el plásmido p19CAT que contiene 2250 pb. correspondiente a la región 5' flanqueante del gen de p19 dirigiendo la expresión del gen reportero Cloranfenicol Acetiltransferasa y tratadas o no con CPT 20 nM por 24, 48, y 72 h. (B) MEFs transfectados con p19 CAT en cada pasaje en cultivo. La actividad CAT esta relativizada a la expresión del plásmido β -galactosidasa utilizado como control de la eficiencia de tranfección. Las barras representan la media \pm D.E. de dos ensayos independientes realizados por triplicado (A) y cuadruplicado (B) Test de Student: * $p < 0,005$

A continuación nos preguntamos si hay un efecto sinérgico en la actividad del promotor de p19 al inducir los dos tipos de senescencia simultáneamente. Indirectamente este resultado nos permitirá inferir si las vías de señalización involucradas en la activación de p19 son las mismas o corresponden a vías diferentes.

Para ello, en cada uno de los pasajes, los MEFs fueron transfectados con p19CAT y tratados con el genotóxico. Por consiguiente en los últimos pasajes (senescencia replicativa) que fueron tratados con CPT (senescencia genotóxica) se observará el efecto de ambos inductores en la activación del promotor de p19.

Como se observa en la fig. 19 el efecto ejercido, sobre la actividad del promotor de p19, tanto por senescencia replicativa como genotóxica es aditivo. Esto sugeriría que ambos tipos de senescencia inducen p19 por medio de vías de señalización diferentes.

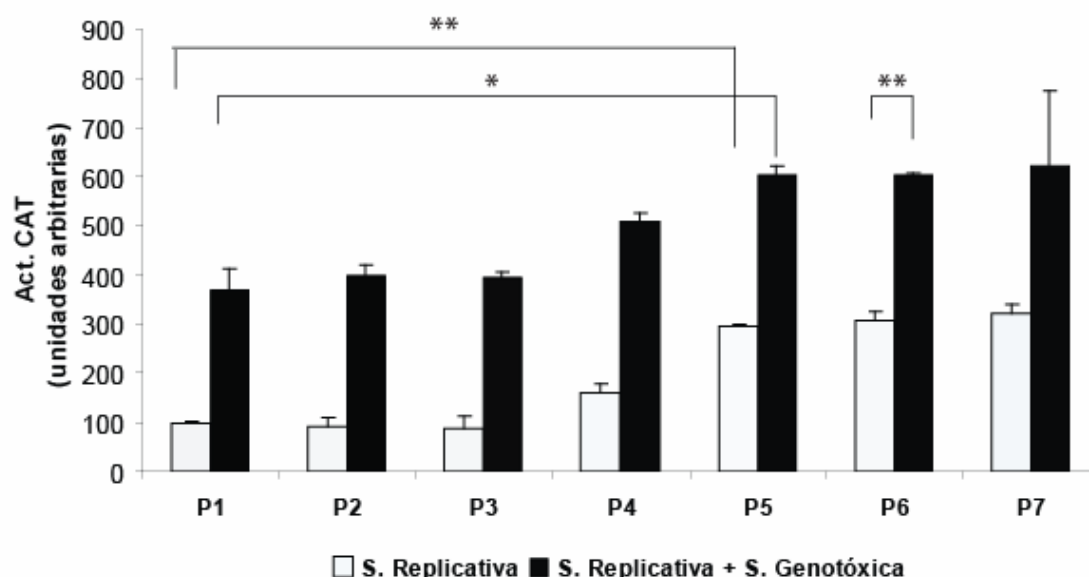


Fig. 19: *Actividad del promotor de p19*, MEFs fueron transfectados en cada pasaje con el promotor de p19 guiando la expresión del gen reportero CAT Cloranfenicol Acetiltransferasa (p19CAT) y a su vez en cada pasaje fueron tratados o no con CPT. La actividad CAT esta relativizada a la expresión del plásmido β -galactosidasa utilizado como control de la eficiencia de transfección. Las barras representan la media \pm D.E. de dos ensayos independientes realizados por cuadruplicado. Test de Student: ** $p < 0,005$, * $p < 0,05$

6.2 ¿Esta involucrado el factor E2F en la inducción de p19?

Una vez demostrado que la inducción de p19 esta regulada a nivel transcripcional nuestro siguiente objetivo consistió en determinar cuales son los elementos presentes en el promotor y los factores de transcripción involucrados en la inducción de p19.

En nuestro laboratorio se demostró que en el promotor de p19 hay cuatro sitios de unión para el factor de transcripción E2F (A, B, C, D) de los cuales solo dos de ellos (C y D) están involucrados en la inducción de p19. Los sitios C y D son necesarios tanto para su función en condiciones normales, relacionada a la periodicidad de su expresión en el ciclo celular, como en el aumento en respuesta al tratamiento con distintos agentes genotóxicos (Carcagno et al., 2011).

En vista de este mecanismo de regulación ya reportado, nos preguntamos si E2F1 estaría involucrado en la inducción de p19 en respuesta a ambos tipos de senescencia. Para ello se utilizó como herramienta un plásmido p19CAT mutado en los sitios C y D (p19CAT CDmut). Estas mutaciones impiden la unión del factor de transcripción E2F1 al promotor de p19. Tal como se observa en la figura 20 la funcionalidad de estos sitios es necesaria para el aumento observado en respuesta al tratamiento con el estímulo de senescencia genotóxica tanto en células BHK-21 como HEK293.

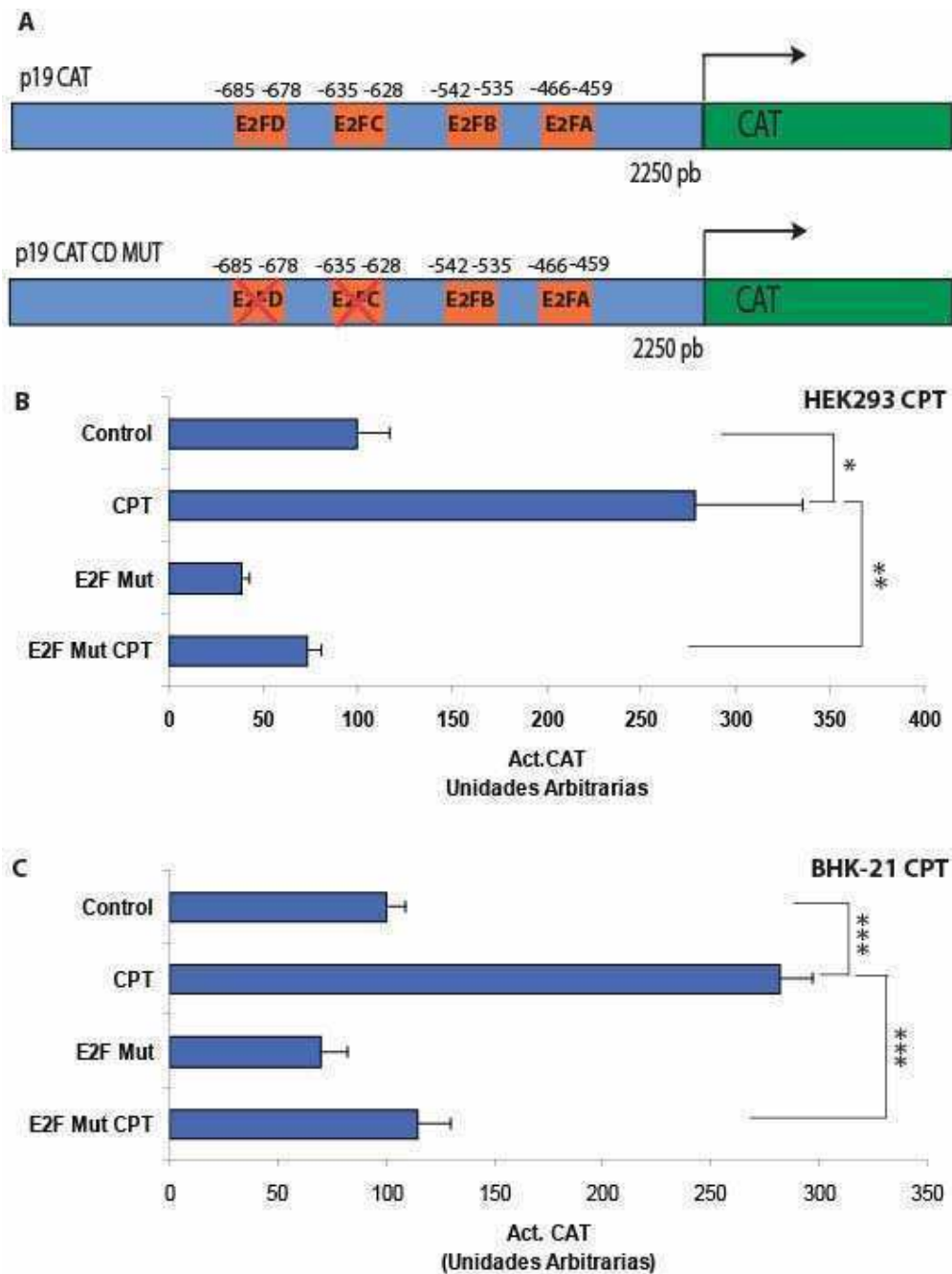


Fig. 20: A, esquema representativo del promotor de p19 con los cuatro sitios de unión para E2F1 de los cuales se demostró que C y D son funcionales. B y C Células HEK293 y BHK-21 respectivamente, fueron transfectadas transientemente con la versión WT del promotor de p19 (p19CAT) y la mutada que impide la unión de E2F1 a los sitios C y D presentes en el promotor (p19CATCDMut). Posteriormente fueron tratadas por 24 h. con CPT y se analizó la actividad CAT. La actividad CAT esta relativizada a la expresión del plásmido β -galactosidasa utilizado como control de la eficiencia de transfección. Las barras representan la media \pm D.E. de dos ensayos independientes realizados por triplicado. Test de Student: *** $p < 0,005$, ** $p < 0,025$, * $p < 0,05$

Para confirmar los resultados descritos anteriormente, y con el propósito de analizar si hay cambios en los niveles endógenos del mRNA de p19 cuando E2F no se puede unir a su promotor, se utilizó un oligodeoxinucleótido *decoy* conteniendo en su secuencia el sitio de unión para E2F. El mismo fue transfectado en células HEK293, tratadas o no con CPT, y por northern blot se analizaron los cambios de expresión de p19.

Se observa que la inducción del mRNA de p19 en las células tratadas con CPT fue bloqueada por el *decoy* de E2F, confirmando que la unión de este factor de transcripción al promotor es necesaria para la inducción de p19 en respuesta a la senescencia genotóxica (Fig. 21).



Fig. 21: Efecto ejercido por el decoy de E2F1, Células HEK293 fueron tratadas o no con CPT y a su vez puestas en presencia o ausencia del oligonucleótido decoy para E2F1. El mRNA fue aislado y por northern blot se analizó la expresión de p19.

Nuestro siguiente objetivo fue comprobar si en senescencia fisiológica, al igual que en senescencia genotóxica, el factor de transcripción E2F1 es determinante para la inducción de la expresión de p19. Para ello se realizaron transfecciones transientes utilizando el plásmido p19CAT WT y su versión mutada en los sitios de unión del factor de transcripción E2F (p19CAT CDMut). Las mismas fueron realizadas en MEFs de pasaje bajo (P2) y pasaje alto (P5).

Como se observa en la figura 22 los sitios E2F no están involucrados en el aumento de la actividad del promotor de p19 en senescencia fisiológica. La actividad transcripcional del promotor de p19 es inducida tanto si se utiliza la versión salvaje como la que tiene los dos sitios de unión a E2F mutados. Estos resultados indican que la inducción de p19 en senescencia replicativa no depende de E2F1, en coincidencia con la hipótesis de que las vías de señalización involucradas en la inducción de p19 en respuesta a senescencia genotóxica y replicativa son diferentes.

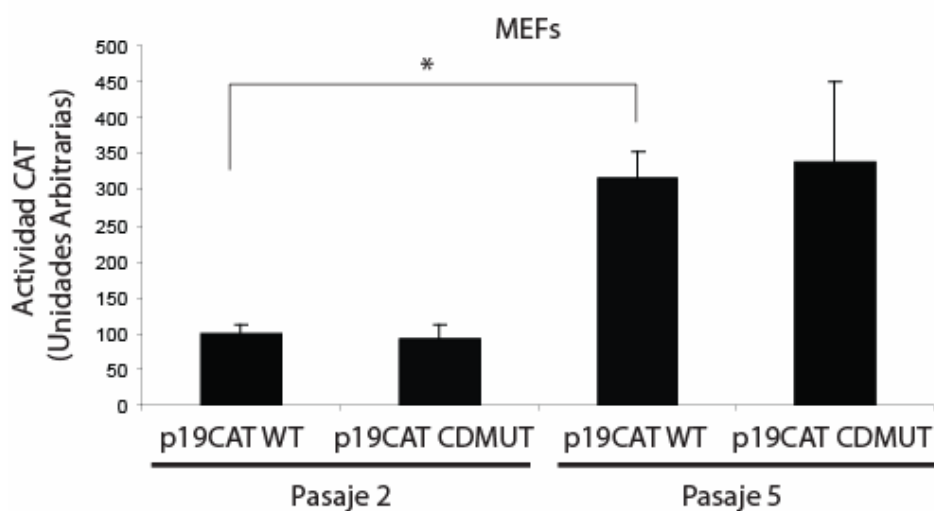


Fig. 22: *Funcionalidad de sitios E2F1 presentes en el promotor de p19*, MEFs de pasaje bajo y alto fueron transfectados con la versión WT del promotor de p19 (p19CAT) y la mutada que impide la unión del factor de transcripción E2F1 (p19CATCDMut.). La actividad CAT fue medida y relativizada a la expresión del plásmido β -galactosidasa utilizado como control de la eficiencia de transfección. Las barras representan la media \pm D.E. de dos ensayos independientes realizados por triplicado. Test de Student: * $p < 0,005$

A continuación sometimos a los MEFs a ambos tipos de senescencia. Para ello MEFs de pasaje 2 y pasaje 5 fueron tratados con CPT 20 nM y transfectados con la versión salvaje (p19CAT) o mutada (p19CAT CDMut.) del promotor de p19. En las células de pasaje bajo se observó el mismo resultado obtenido en células BHK-21 y HEK293 confirmando que, en senescencia genotóxica, la inducción de p19 depende de E2F (Fig. 23). En los MEFs de pasaje alto se observa el efecto aditivo, en la activación del promotor de p19, cuando se inducen ambos tipos de senescencia. Por último, en los MEFs correspondientes al pasaje 5 y tratados con CPT se puede notar que, cuando se compara la actividad transcripcional de los promotores salvaje y mutado, solamente baja la activación del promotor producida en respuesta al tratamiento con CPT, manteniéndose sin cambios significativos lo que corresponde al aumento en respuesta a senescencia fisiológica (Fig.23).

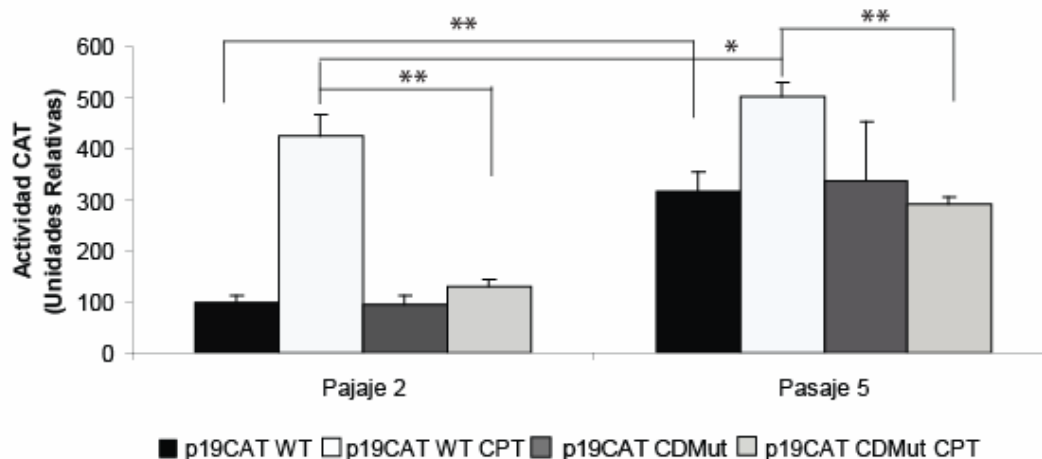


Fig. 23: (A) Funcionalidad de los sitios E2F presentes en el promotor de p19 cuando se inducen los dos tipos de senescencia, las células MEFs de pasaje bajo y alto fueron transfectados con la versión WT y mutada del gen reportero p19 CAT y además en cada pasaje fueron tratadas con CPT por 24 h. La actividad CAT fue medida y relativizada a la expresión del plásmido β -galactosidasa utilizado como control de la eficiencia de transfección. Las barras representan la media \pm D.E. de dos ensayos independientes realizados por triplicado. Test de Student: ** $p < 0,005$, * $p < 0,05$

6.3 ¿Cual es la región regulatoria mínima necesaria para la inducción de p19 en senescencia?

Según los resultados expuestos, la inducción de p19 en senescencia por estrés genotóxico depende del aumento de la actividad transcripcional del promotor debido a la presencia de dos sitios de unión para el factor E2F1. Sin embargo, en senescencia fisiológica, pese a que hay un efecto inductor a nivel transcripcional, este es independiente de los sitios E2F1. Con el objetivo de determinar la zona regulatoria mínima necesaria para la inducción de p19 en respuesta a senescencia, se procedió a la construcción de vectores de expresión con deleciones seriadas de la región 5' regulatoria del gen de p19.

Las construcciones con deleciones seriadas fueron realizadas a partir del vector p19CAT que contiene 2250 pb (FL *Full Length*). Se obtuvieron un total de cinco mutantes de deleción las cuales se detallan en la siguiente tabla.

1	p19CAT Δ 1500	1500 pb
2	p19CAT Δ 1000	1000 pb
3	p19CAT Δ 750	750 pb
4	p19CAT Δ 500	500 pb
5	p19CAT Δ 250	250 pb

Tabla 1: *Mutantes de deleción*: Realizadas a partir del vector de expresión p19CAT el cual contiene 2400 pb de la región 5'-regulatoria del gen de p19 y río arriba posee el gen reportero CAT (p19CAT FL)

Las distintas mutantes fueron transfectadas en MEFs de pasaje bajo y alto y a su vez en cada pasaje se trató a las células con CPT.

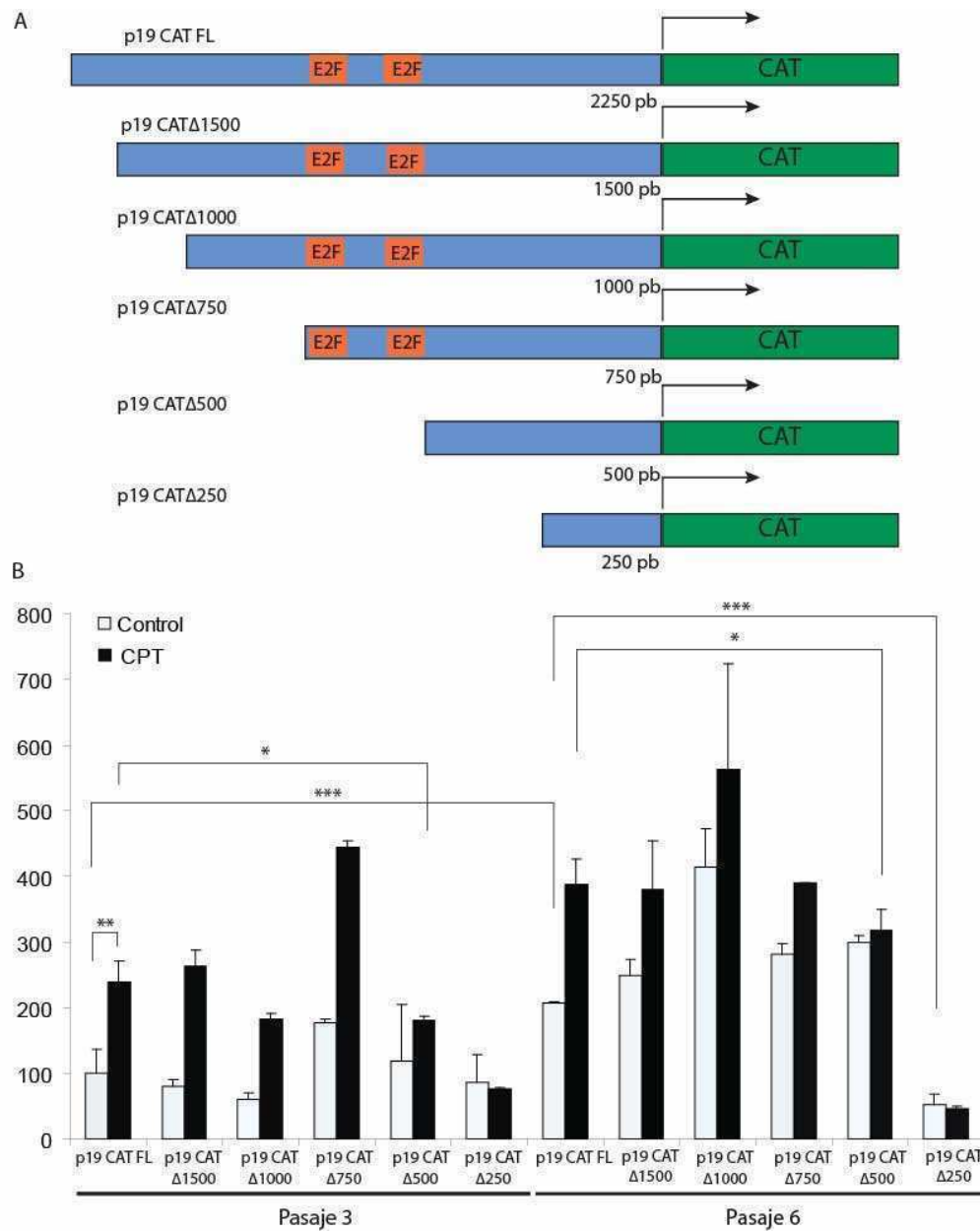


Fig. 24: A, Esquema representativo de las mutantes de delección construidas a partir del plásmido p19CAT *Full Length* (utilizado en experimentos anteriores). Como referencia se muestran los sitios de unión para E2F, los cuales no están presentes a partir de la mutante p19CAT Δ 500. B, MEFs de pasaje bajo y alto fueron transfectados con cada una de las mutantes de delección y a su vez fueron tratados con CPT por 24h. La actividad CAT fue medida y relativizada a la expresión del plásmido β -galactosidasa utilizado como control de la eficiencia de tranfección. Las barras representan la media \pm D.E. de dos ensayos independientes realizados por triplicado. Test de Student: *** p < 0,005, ** p < 0,05, * p < 0,1

Los resultados obtenidos en los experimentos con MEFs en pasaje bajo, y que se muestran en la figura 24B, indican que la zona regulatoria mínima necesaria para la inducción de p19 en respuesta a senescencia genotóxica es el fragmento de 750 pb (mutante p19CAT Δ 750). Cuando se utilizaron las mutantes p19CAT Δ 500 y p19CAT Δ 250 no se observó inducción en respuesta a CPT. Dado que los elementos de unión a E2F están localizados en (-685-678 y -635-628), estos resultados confirman que, en este tipo de senescencia, la inducción se ejerce a través de la unión de E2F1.

Comparando los resultados de actividad transcripcional de p19 obtenidos en MEFs de pasaje bajo y alto, en ausencia de CPT, se puede observar que el aumento en la actividad del promotor, que corresponde a la senescencia fisiológica, se reduce significativamente cuando se utiliza la mutante p19CAT Δ 250 (Figura 24B).

Estos resultados nos permiten afirmar que entre las posiciones -500 y -250 se encontrarían elementos imprescindibles para el aumento en la actividad del promotor en respuesta a senescencia fisiológica.

Por último, si se compara la actividad transcripcional del promotor de p19 en MEFs de pasaje alto tratados o no con CPT, se observa que con la mutante de delección p19CAT Δ 500 se pierde el efecto inductor de la senescencia genotóxica pero no el de la senescencia replicativa, confirmando los resultados anteriores.

En resumen, podemos afirmar que para senescencia genotóxica la región promotora mínima necesaria para la inducción de p19 corresponde al fragmento de 750 pb y además se necesita la unión del factor de transcripción E2F para observar el aumento en la actividad del promotor en respuesta a CPT. En senescencia fisiológica la región promotora mínima necesaria corresponde al fragmento de 500 pb. Entre las posiciones -500 y -250 habría elementos necesarios para el aumento en la actividad del promotor.

7. Vías de transducción de señales involucradas en la inducción de la expresión de p19 en senescencia

7.1 ATM y ATR son necesarias para la inducción de p19 en senescencia

Actualmente se postula que todas las formas de inducción de senescencia requieren la activación de la respuesta celular frente al daño al ADN (DDR) (Hemann and Narita, 2007; Wahl and Carr, 2001; Yaswen and Campisi, 2007). Como se ha descrito, en senescencia fisiológica se produce un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y el acortamiento de los telómeros (Bodnar et al., 1998; Harley et al., 1990; Lou and Chen, 2006; Parrinello et al., 2003). Ambos inductores, como también el uso directo de genotóxicos como CPT, representan situaciones de estrés celular que activan mecanismos relacionados con el daño al ADN. ATM y ATR, miembros de la familia de proteínas relacionadas a la fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3-K-like), son las encargadas de transducir señales iniciadas por las proteínas sensoras del daño, fosforilando en consecuencia un gran número de sustratos (Niida and Nakanishi, 2006). Un punto central en la coordinación de las vías involucradas en la respuesta al daño al ADN consiste en la activación de estas enzimas.

Con el objeto de estudiar la participación de ATM y ATR en la inducción de p19 en respuesta a ambos tipos de senescencia, se utilizó cafeína como inhibidor de los miembros de la familia PI3-K-like. Actualmente se sabe que la supresión de ATM y ATR por cafeína, afecta la regulación de las vías de señalización asociadas al daño al ADN (Costanzo et al., 2003; Sarkaria et al., 1999). A su vez también se utilizó un inhibidor específico de ATM (Ku-55933). Este impide la autofosforilación de la misma ya que compite con el ATP por su sitio de unión (Hickson et al., 2004).

Para el modelo de senescencia genotóxica, células WI-38 fueron tratadas con CPT e incubadas con los inhibidores cafeína y Ku-55933. De igual manera, para senescencia fisiológica, MEFs, de pasaje bajo y alto fueron incubados con cafeína y Ku-55933. En ambos casos se analizaron cambios en la expresión de p19 por northern blot.

Como se observa en la figura 25 A, el aumento en el transcritto de p19 en respuesta al tratamiento con CPT es inhibido drásticamente cuando las células fueron incubadas con cafeína o Ku-55933. A su vez en senescencia replicativa se observó el mismo efecto. Cuando MEFs (Fig. 25 C) de pasaje alto fueron incubados en presencia de cafeína o Ku-55933 se observó un bloqueo de la inducción en los niveles del transcritto de p19.

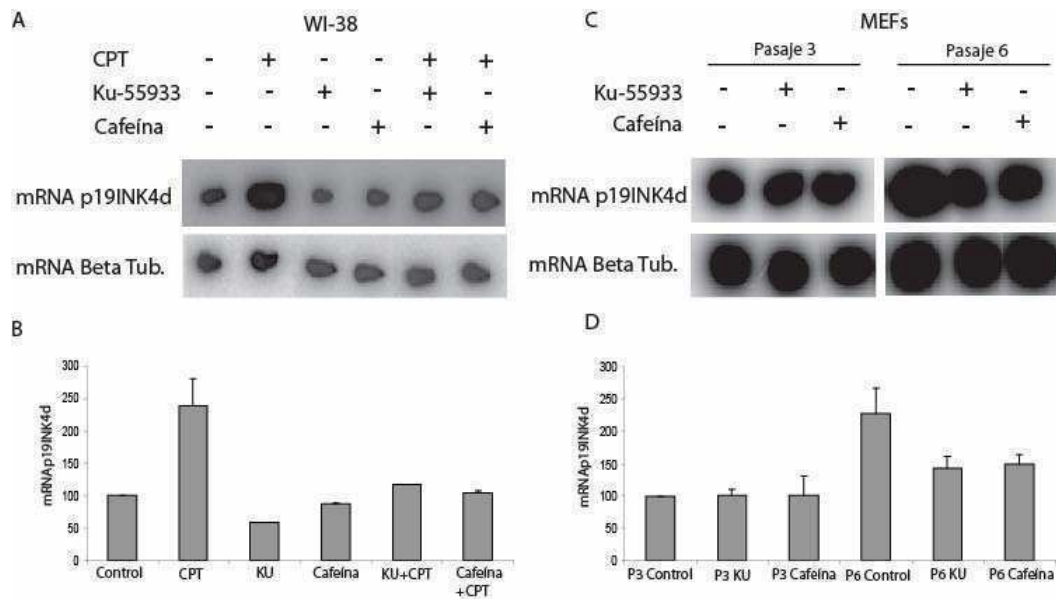


Fig. 25: Efecto ejercido por los inhibidores cafeína y ku-55933, (A) Células Wi-38 fueron incubadas con CPT, los respectivos inhibidores de ATM (10 uM) y ATR (5mM), o en presencia de CPT y cada uno de los inhibidores por 24 h. (B) MEFs de pasaje bajo (P3) y alto (P6) fueron incubados o no con los inhibidores cafeína y Ku-55933 por 24 h. En ambos casos el mRNA fue aislado y por northern blot se analizó la expresión de p19. (C y D) cuantificación de A y B respectivamente, las barras representan la media \pm D.E. de dos ensayos independientes

Para profundizar el análisis acerca de la participación de ATM/ATR, realizamos experimentos con el gen reportero p19CAT utilizando el inhibidor específico de ATM, Ku-55933. Para el modelo de senescencia genotóxica células BHK-21 y HEK293 fueron transfectadas con el plásmido p19CAT y luego tratadas con CPT e incubadas con el inhibidor Ku-55933. Para senescencia replicativa se transfectaron MEFs de pasaje bajo y alto con p19CAT y luego incubadas o no con el inhibidor Ku-55933.

Los resultados que se muestran en la Fig. 26 indican que, tanto en senescencia genotóxica como replicativa, ATM esta involucrada en la inducción de p19. Cuando las células fueron tratadas con CPT y Ku-55933 la inducción de la actividad del promotor de p19 resultó significativamente inhibida. De igual manera, cuando MEFs de pasaje alto fueron tratados con el inhibidor de ATM se redujo la activación del promotor en respuesta a senescencia replicativa.

A partir de estos experimentos podemos confirmar que ATM esta involucrada en la inducción de p19 por senescencia genotóxica y fisiológica. Sin embargo, no se descarta que ambas, ATM y ATR sean, necesarias para la inducción de p19 en ambos tipos de senescencia.

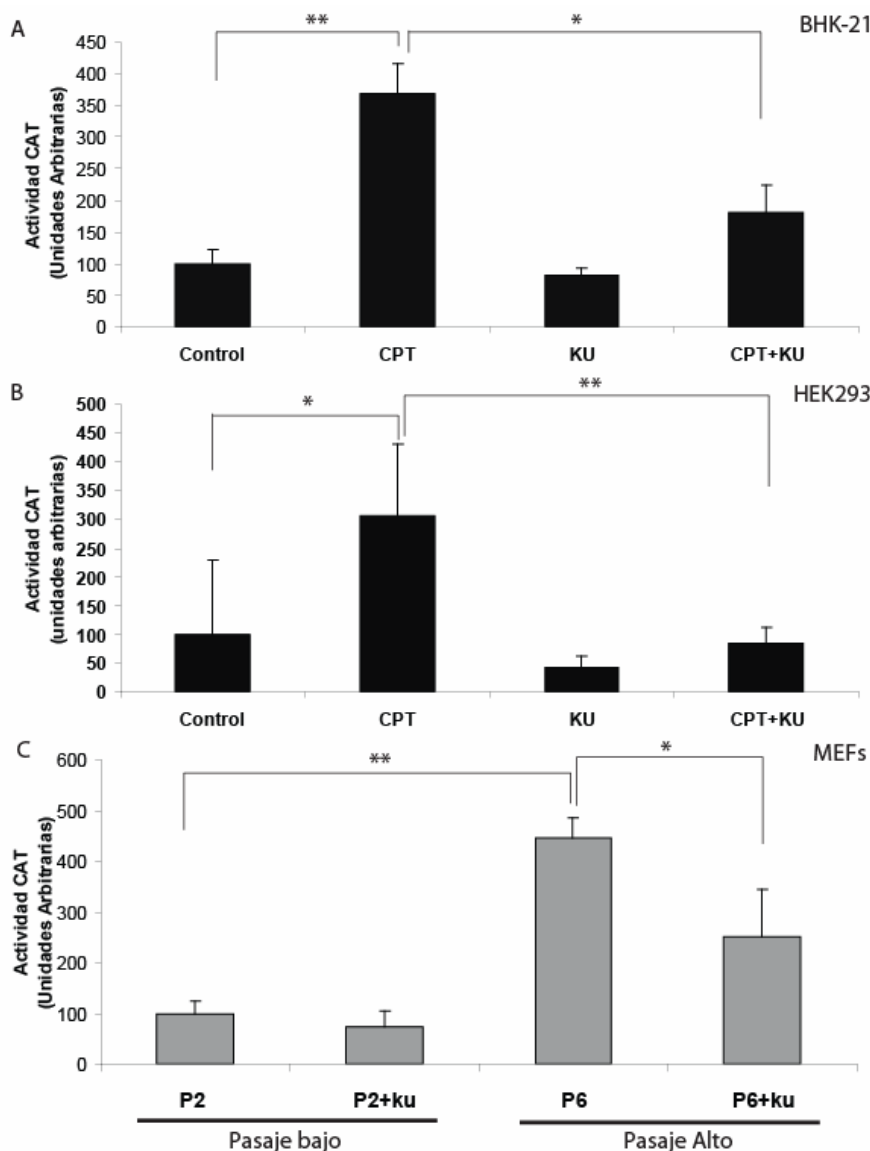


Fig. 26: Efecto del inhibidor de ATM, (A y B) senescencia genotóxica células BHK-21 y HEK293 respectivamente fueron transfectadas con el plásmido p19 CAT, tratadas con CPT e incubadas con el inhibidor Ku-55933 (2,2 nM) por 24h. (C) senescencia fisiológica MEFs de pasaje bajo y alto fueron transfectados con el plásmido p19CAT e incubados con el inhibidor de ATM. La actividad CAT fue medida y relativizada a la expresión del plásmido β -galactosidasa utilizado como control de la eficiencia de transfección. Las barras representan la media \pm D.E. de dos ensayos independientes realizados por triplicado. Test de Student: (A)** $p < 0,005$, * $p < 0,01$ (B) ** $p < 0,05$ * $p < 0,1$, (C) ** $p < 0,005$, * $p < 0,1$

7.2 La inducción de p19 en senescencia depende de Chk1 y no de Chk2

A continuación se analizó la participación de las quinasas Chk1 y Chk2 (*checkpoint kinases*) dado que son los blancos principales de las quinasas ATR y ATM y se activan en respuesta a distintos tipos de insultos genotóxicos (Bartek and Lukas, 2001; McGowan, 2002). Chk2 se expresa a lo largo del ciclo celular (Lukas et al., 2001) y se encuentra inactiva en ausencia de daño al ADN. La misma es activada principalmente

por ATM en respuesta al daño de doble cadena (*double-strand DNA breaks, DSBs*), y su activación implica dimerización y autofosforilación (Lukas et al., 2003). Chk1 se expresa exclusivamente en fases S y G2 del ciclo celular (Lukas et al., 2001) y, al igual que Chk2, se activa en respuesta al daño. Chk1 es fosforilada principalmente por ATR, sin embargo, también se vio que puede ser activada por ATM (Gatei et al., 2003; Sorensen et al., 2003).

Para evaluar si estas quinasas están involucradas en el aumento de p19 asociado a ambos tipos de senescencia, se utilizaron los inhibidores SB218078 y Chk2 *Inhibitor* (Chk2i). SB218078 es un inhibidor potente y selectivo de Chk1 ya que impide la fosforilación y activación de esta proteína dado que compite con el ATP por su sitio de unión (Jackson et al., 2000). Chk2i es un potente inhibidor de Chk2 ya que se une al bolsillo de ATP, impidiendo su fosforilación (Arienti et al., 2005).

En el modelo de senescencia genotóxica, células WI-38 fueron tratadas con CPT e incubadas con los inhibidores SB218078 y Chk2i, respectivamente. En senescencia fisiológica, MEFs de pasaje bajo (P3) y pasaje alto (P6) fueron incubadas con los respectivos inhibidores de Chk1 y Chk2. En ambos casos se analizaron los cambios en la expresión de p19 por northern blot.

En la figura 27 se observa que Chk1 esta involucrada en la inducción de p19 ya que, en ambos modelos de senescencia, la inducción de p19 es bloqueada cuando las células fueron incubadas en presencia del compuesto SB218078. Sin embargo, no se observaron cambios cuando las células fueron tratadas con el inhibidor de Chk2.

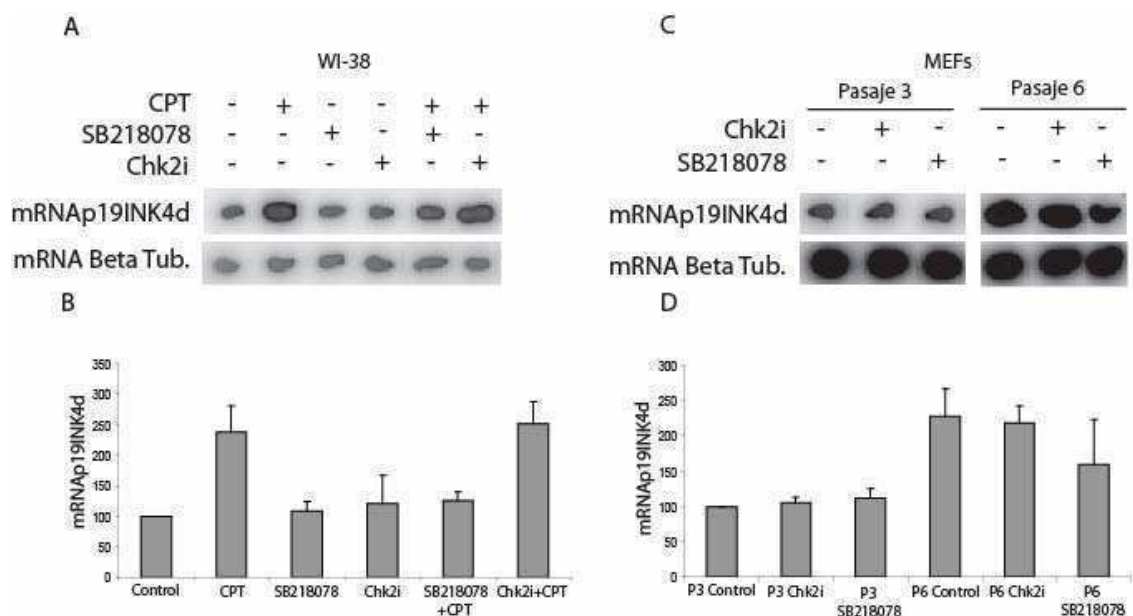


Fig. 27: Efecto ejercido por los inhibidores de Chk1 y Chk2, (A) Células WI-38 fueron incubadas o no con CPT, con cada inhibidor, SB218078 (15nM) o Chk2i (20nM), y en presencia de CPT mas cada uno de los inhibidores. (B) MEFs de pasaje bajo (P3) y alto (P6) fueron incubados o no con el inhibidor SB218078 o Chk2i. Para cada tipo celular y en los dos tipos de senescencia el mRNA fue aislado y por northern blot se analizó la expresión de p19. (C y D) cuantificación de A y B respectivamente. Las barras representan la media \pm D.E. de dos ensayos independientes.

7.3 p38, una quinasa activada por estrés, esta involucrada en la inducción de p19 en senescencia

Posteriormente se estudió la participación de p38 en la inducción de p19 para ambos tipos de senescencia, y en particular la participación de JNK en senescencia genotóxica. Tanto p38 como JNK son miembros de la familia de quinazas activadas por estrés (*Stress-Activated Protein Kinase, SAPK*). Las mismas se activan en respuesta a distintos estímulos estresantes (irradiación UV, *shock* osmótico, *shock* térmico y estrés oxidativo) activando, en consecuencia, mecanismos de senescencia o apoptosis (Funayama and Ishikawa, 2007; Kyriakis and Avruch, 2001). En relación a p38, se vio que su inhibición retrasa o impide la senescencia replicativa inducida por estrés oxidativo o por activación oncogénica (Ishikawa, 2003; Iwasa et al., 2003; Wang et al., 2002).

Para determinar si p38 esta implicada en la inducción de p19 se utilizó el inhibidor SB203080 para ambos tipos de senescencia. En senescencia genotóxica también se verificó si el aumento de p19 esta relacionado a la participación de JNK, para ello se utilizó el inhibidor selectivo SP60125.

Por un lado células WI-38 fueron tratadas con CPT e incubadas con SB203080 (10uM) y SP60125 (25uM). Por otra lado MEFs de pasaje bajo (P3) y alto (P6) fueron incubados o no con el inhibidor de p38, SB203080 (10uM). Los cambios en la expresión de p19 fueron analizados por northern blot.

A partir de estos resultados se confirmó que p38 esta involucrada en la inducción de p19 para ambos tipos de senescencia, ya que no se observó inducción del mRNA de p19 cuando las células fueron tratadas con el inhibidor, tanto en presencia de CPT como en el pasaje alto (Fig. 28). Sin embargo, en senescencia genotóxica no se observaron cambios en la expresión de p19 cuando las células fueron incubadas con el inhibidor de JNK (SP60125).

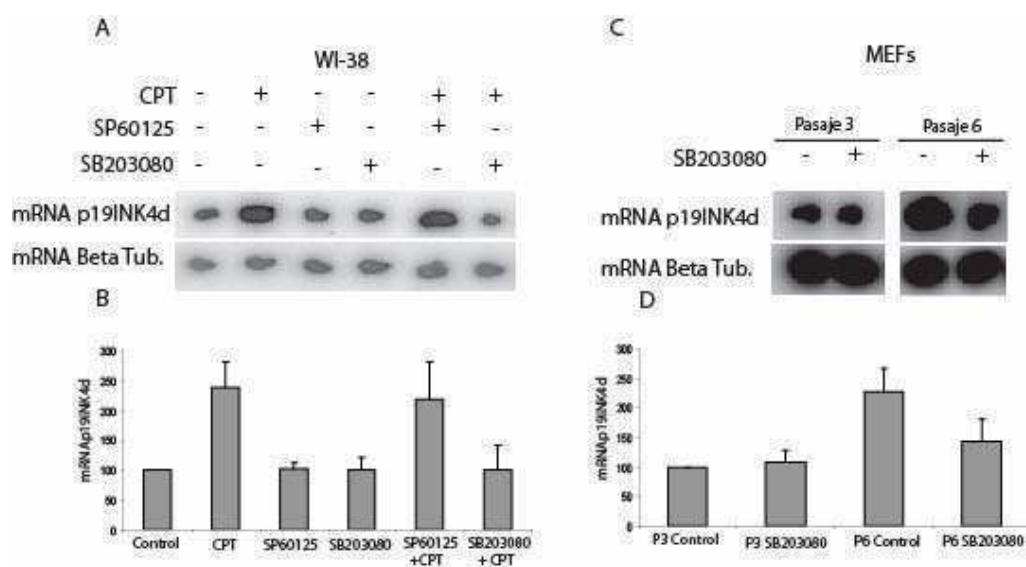


Fig. 28: Efecto ejercido por el inhibidor de p38 en ambos tipos de senescencia: (A) Para el modelos de senescencia genotóxica células Wi-38 fueron tratadas con CPT e incubadas en presencia del inhibidor de p38 (SB203080 10uM) y además con un inhibidor de JNK (SP60125 25uM). (B) Senescencia fisiológica, MEFs de pasaje bajo (P3) y alto (P6) fueron tratadas únicamente con el inhibidor de p38 (SB203080 10uM). Para cada tipo celular y en los dos tipos de senescencia el mRNA fue aislado y por northern blot se analizó la expresión de p19. (C y D) cuantificación de A y B respectivamente. Las barras representan la media \pm D.E. de dos ensayos independientes.

7.4 p53 esta involucrada en la inducción de p19 en respuesta a senescencia genotóxica

Nuestro siguiente objetivo fue estudiar la participación de p53 en la inducción de p19 en respuesta a senescencia genotóxica. Esta proteína juega un rol muy importante tanto en el establecimiento como en el mantenimiento del estado de senescencia. En respuesta a un estímulo senescente p53 es controlada por dos grandes vías de señalización (Wahl and Carr, 2001). Una de ellas está relacionada con la respuesta general al daño y es

mediada por ATM/ATR y Chk1/Chk2, las cuales intervienen en la estabilización post-traduccional de p53 a través de su fosforilación (Ben-Porath and Weinberg, 2005). De esta manera activa su principal blanco transcripcional en senescencia, el gen de p21 (Brown et al., 1997). Por otro lado, la proteína ARF secuestra a Mdm2 impidiendo que esta proteína señalice a p53 para su degradación (Lowe and Sherr, 2003).

Células BKH-21 fueron transfectadas con un oligonucleótido *decoy* para p53 en su versión salvaje (WT) y mutado (Mut) y luego tratadas por 24 h con CPT 20nM. Los cambios en la expresión de p19 fueron analizados por northern y western blot.

Según se puede apreciar en las figura 29, la inducción de p19, tanto el mRNA como la proteína, en las células tratadas con CPT es anulada cuando las células son transfectadas con el *decoy* p53 WT. Por el contrario, la transfección con el *decoy* p53 mutado no causó ningún efecto. Estos resultados sugieren un posible rol de p53 en la inducción de p19 en este tipo de senescencia.

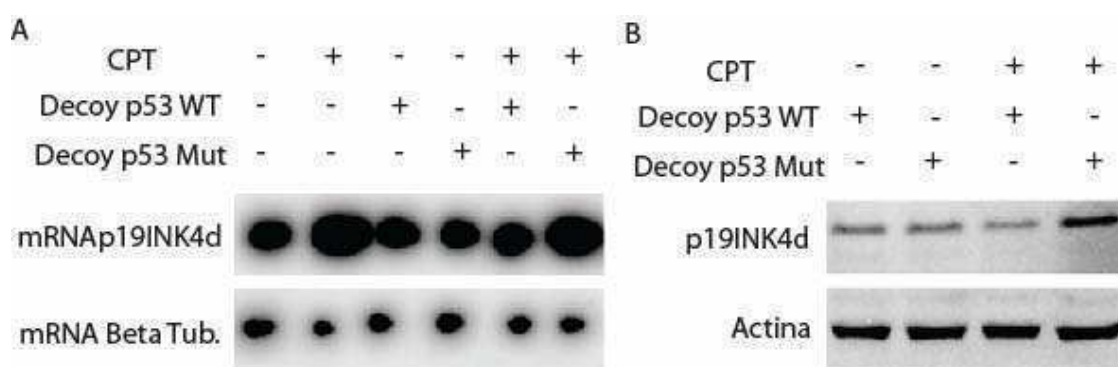


Fig. 29: (A y B) Northern y western blot respectivamente realizado en células BKH-21 que fueron transfectadas con un oligonucleotido decoy de p53 en su versión WT (100nM) y mutado (100 nM). Además las células fueron tratadas o no con CPT 20 nM. (A) El mRNA fue aislado y por northern blot se analizó la expresión de p19 (B) Se realizó la extracción de proteínas totales y se analizaron los cambios a nivel proteico de p19.

En resumen, nuestros resultados sugieren que, el aumento en la expresión de p19 inducida por senescencia, estaría mediado por la vía de señalización relacionada a la respuesta general al daño, es decir la vía ATM/ATR - Chk1 - p53. Por otro lado, también se observó que p38 está involucrada en la inducción de p19. Se ha reportado que esta quinasa induce el arresto irreversible por intermedio de pRb. Sin embargo, no se descarta que actúe también por intermedio de p53 (Ishikawa, 2003). De este modo, p38 podría activar a p19 en respuesta a senescencia a través de las vías asociadas a p53 o a pRb.

8. Unión de p19 a la cromatina en respuesta a senescencia

Actualmente se ha propuesto que la célula posee al menos dos mecanismos para asegurar la irreversibilidad del arresto en senescencia. Uno de ellos es la activación persistente de la respuesta general al daño DDR, la cual interviene imponiendo un checkpoint permanente (d'Adda di Fagagna, 2008; d'Adda di Fagagna et al., 2003; Di Leonardo et al., 1994). El otro mecanismo está asociado a la heterocromatinización global del ADN y en consecuencia la formación de SAHF (*senescence-associated heterochromatin foci*), los cuales corresponden a cromatina altamente compactada encargada de suprimir la transcripción de genes asociados a la proliferación celular (Funayama and Ishikawa, 2007; Narita et al., 2003; Zhang et al., 2007).

Según evidencias encontradas en nuestro laboratorio, p19 tiene la capacidad de interactuar con el ADN sin mucha especificidad de secuencia. Por otro lado, p19 es una proteína mayoritariamente citoplasmática que, en respuesta al tratamiento con genotóxicos, transloca al núcleo (Ceruti et al., 2005) (Marazita M. et al., manuscrito enviado a publicar). A partir de estos resultados, nos preguntamos cuál es la localización subcelular y, en consecuencia, el sitio de acción de p19 en respuesta a la senescencia.

Para ello utilizamos un método de fraccionamiento subcelular y, mediante western blot, se analizó la presencia de p19 en cada una de las fracciones (citoplasma, nucleoplasma y cromatina) en células tratadas o no con el genotóxico y en MEFs de pasaje bajo y alto. La pureza de cada fracción fue controlada a través de la determinación de GAPDH, como marcador de citoplasma, e histona H3 total, como marcador de cromatina.

Como se observa en la Fig. 30 hay un aumento en la cantidad de p19 unida a la fracción cromatínica en respuesta a ambos tipos de senescencia. La senescencia inducida por genotóxicos causa un aumento de la proteína p19, como se observa en el extracto celular total, y un aumento en la fracción cromatínica con la consecuente disminución en las fracciones citoplasmática y nucleoplásmica.

Del mismo modo, la senescencia replicativa promueve un aumento de los niveles totales de p19, lo cual se ve reflejado en el incremento en la fracción cromatínica.

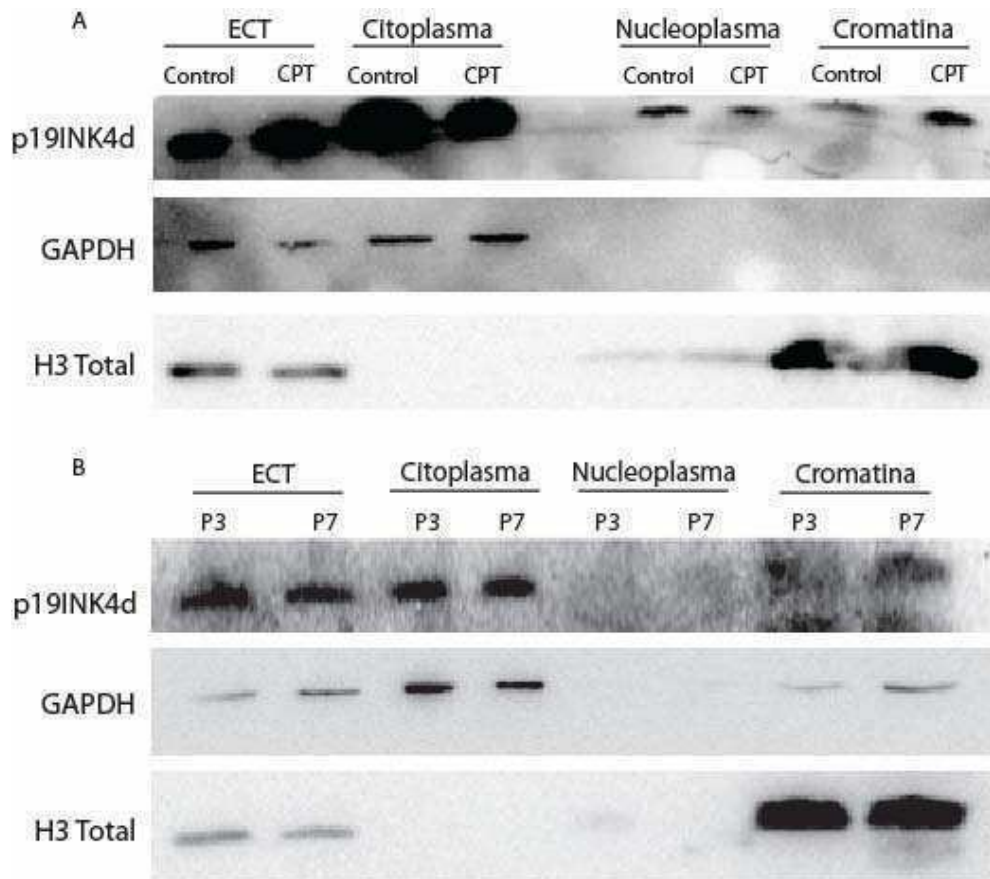


Fig. 30: (A y B) Fraccionamiento subcelular realizado en células (A) HEK293 tratadas o no con CPT por 24 h. y en (B) MEFs de pasaje bajo y alto. Posterior al fraccionamiento se analizó por western blot la expresión de p19 y se determinó la pureza de cada una de las fracciones. GAPDH se utilizó como marcador de la fracción citoplásmica y H3 Total como marcador de la fracción correspondiente a la cromatina.

8.1 p19 interacciona fuertemente con la cromatina en respuesta a senescencia genotóxica

A continuación realizamos experimentos empleando técnicas de inmunofluorescencia con dos objetivos. En primer lugar para confirmar, a partir de la utilización de otro abordaje experimental, la interacción de p19 con la cromatina y, en segundo lugar, para analizar la calidad de esta interacción. Para ello, células WI-38 fueron tratadas o no con CPT 20 nM durante 72 horas. Previamente a la fijación del preparado, las mismas fueron incubadas durante 5 minutos con un buffer que contiene 0,5% de Tritón X-100. El alto contenido de detergente de este buffer permite extraer todos los componentes que se encuentran en forma soluble, aún aquellos que están unidos débilmente a estructuras subcelulares. Si la interacción de p19 a la cromatina es fuerte debería de

resistir la extracción con detergente. En estos experimentos, además de analizar la expresión y localización celular de p19, también se analizó la expresión de la proteína γ HP1, la cual, como se dijo anteriormente, forma parte de los SAHF en senescencia.

Como se puede observar en la figura 31 A y B, en respuesta al tratamiento con CPT se produce una acumulación de p19 en el núcleo. A su vez se observaron pequeños *foci* de γ HP1 en respuesta a senescencia genotóxica. Cuando las células fueron incubadas con el buffer que posee alta concentración de Tritón X-100 (Fig. 32 A y B), se observó que tanto γ HP1 como p19 resisten este tratamiento lo que nos indica que están fuertemente unidas la cromatina. El patrón de expresión de p19 en las células tratadas con CPT parecería ser muy similar al de γ HP1.

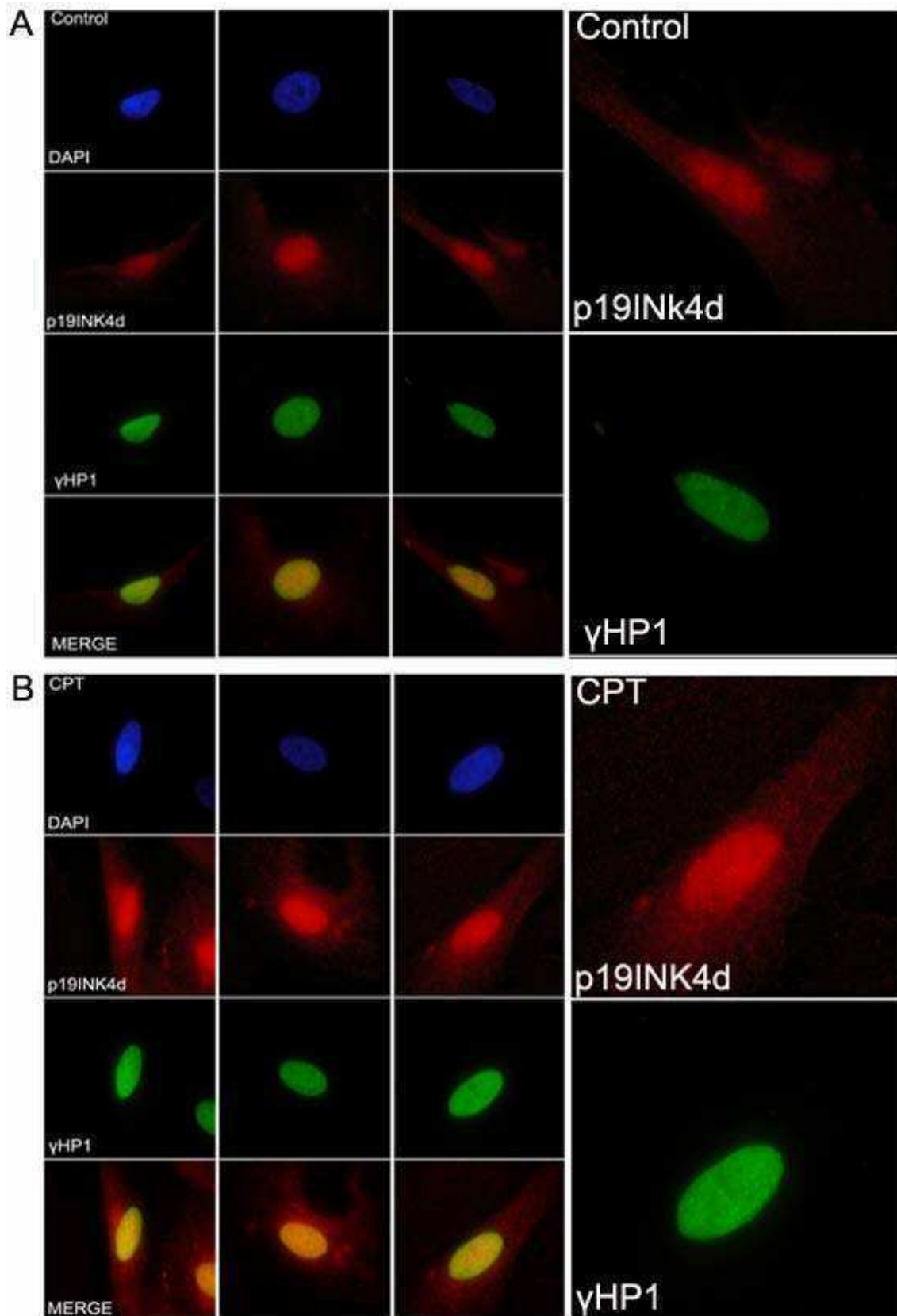


Fig 31: Inmunofluorescencia realizada en células Wi-38 (A) control y (B) tratadas con CPT por 72 h. Se determinó la expresión de p19, la cual se observa en color rojo, y de γ HP1, en color verde. Los anticuerpos secundarios fluorescentes utilizados fueron Alexa 594 (rojo) y alexa 488 (verde).

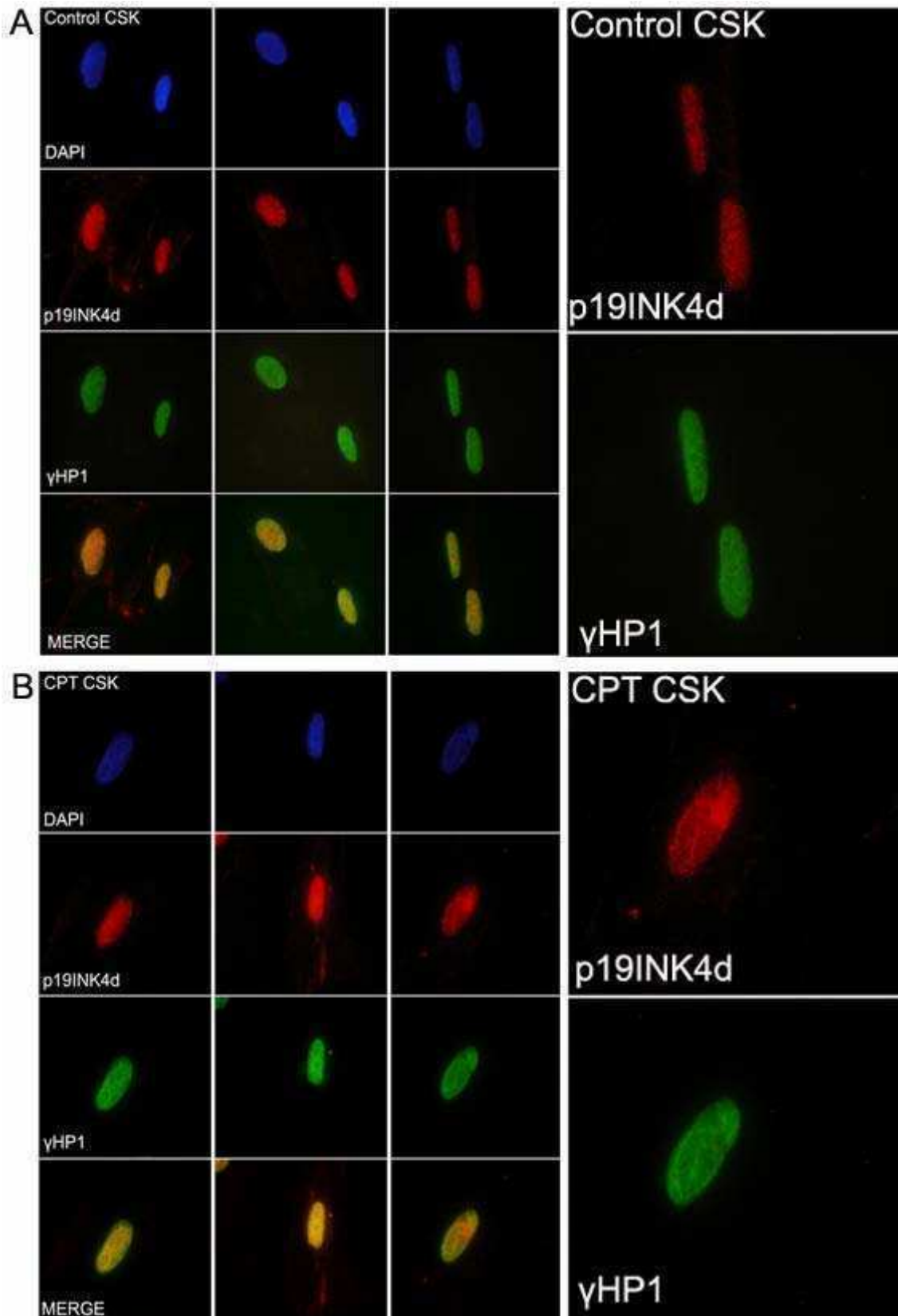


Fig. 32: Inmunofluorescencia realizada posterior a la extracción de las proteínas solubles, en células Wi-38 (A) control y (B) tratadas con CPT por 72 h. Se determinó la expresión de p19, la cual se observa en color rojo, y de γ HP1, en color verde. Los anticuerpos secundarios fluorescentes utilizados fueron Alexa 594 (rojo) y Alexa 488 (verde).

8.2 p19 se une a la heterocromatina en respuesta a senescencia

En vista de los resultados obtenidos y con el objeto de profundizar en la interacción de p19 con la cromatina en respuesta a la senescencia genotóxica, analizamos si esta unión correspondía a la fracción de heterocromatina o eucromatina. Para ello se utilizó un método de fraccionamiento subnuclear que permite separar ambas fracciones. La separación correcta de cada fracción fue confirmada mediante la determinación de α -HP1, como marcador de heterocromatina, y RNA Pol II como marcador de eucromatina.

Como se observa en la figura 33, p19 se encuentra unida mayoritariamente a la fracción de heterocromatina en respuesta a senescencia genotóxica. Como era esperado se observa un aumento en los niveles proteicos de p19 en el extracto total en respuesta al tratamiento con CPT.

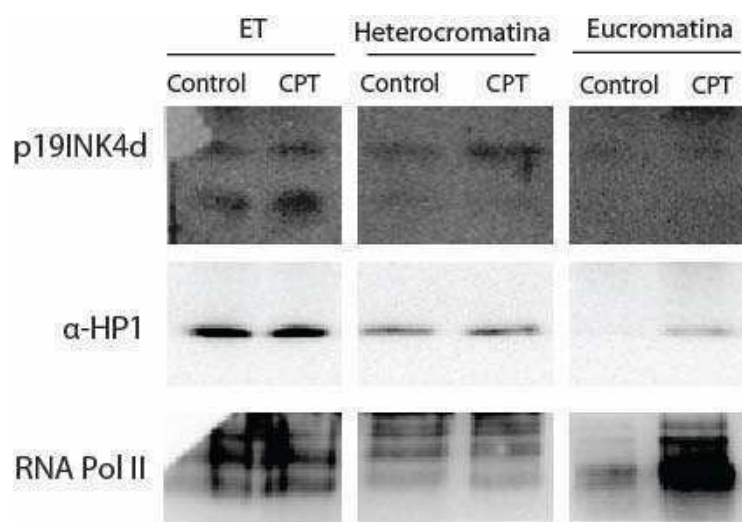


Fig. 33: Fraccionamiento subnuclear realizado en células HEK293 tratadas o no CPT 20nM por 24 h. Mediante western blot se analizó la expresión de p19 y la pureza de cada una de las fracciones fue determinada analizando α -HP1 como marcador de la fracción correspondiente a la heterocromatina y RNAPol II como maracador de la fracción perteneciente a la eucromatina.

En resumen, podemos concluir que p19, en respuesta a un estímulo senescente, transloca al núcleo y se une fuertemente a la cromatina. Dado que, en estos casos, p19 se encuentra enriquecida en la fracción correspondiente a la heterocromatina y que presenta un patrón de localización similar a γ HP1, planteamos como hipótesis que esta proteína podría estar involucrada en el proceso de heterocromatinización global que ocurre durante la senescencia.

9. ¿Hay una correlación fisiológica entre la inducción de p19 y el envejecimiento?

Una de las principales causas del envejecimiento en los organismos multicelulares, que poseen tejidos renovables, es la acumulación de células senescentes a medida que aumenta la edad del organismo y como consecuencia hay una pérdida de la capacidad regenerativa de estos tejidos (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Se sugiere que esto ocurre porque la activación de este mecanismo depletaría a los tejidos de células progenitoras (*stem cells*), afectando la reparación de los mismos, el recambio y la regeneración tisular (Drummond-Barbosa, 2008). Además los factores que secretan las células senescentes afectan procesos vitales como el crecimiento, migración, arquitectura tisular, formación de vasos sanguíneos y diferenciación (Liu and Hornsby, 2007). Por último, la secreción de citoquinas inflamatorias por parte de las células senescentes puede afectar gravemente a las células y tejidos dado que en los procesos inflamatorios se producen potentes oxidantes (Franceschi et al., 2008; Grivennikov et al., 2010)

Nuestro siguiente objetivo consistió en determinar si la inducción de p19, observada en el estado senescente, es un evento limitado a líneas celulares y fibroblastos embrionarios o, por el contrario, una manifestación o causa fisiológica de un estado senescente y, por ende, del envejecimiento de un organismo. Si esto es así, los niveles de p19 en los tejidos de un animal deberían ir en aumento en forma paralela a la edad del mismo.

Para contrastar esta hipótesis y comprobar si hay algún tipo de correlación entre la expresión de p19 y el envejecimiento, se analizaron los niveles de mRNA y proteína de p19 en diversos tejidos de ratones machos de la cepa CF-1 de distintas edades. Se realizó la disección de cada uno de los ratones de las siguientes edades: 1, 6, 12 y 18 meses, y se procedió a la extracción de los siguientes tejidos: testículo, cerebro, bazo, timo, páncreas, riñón, pulmón, corazón e hígado.

Como se observa en la figura 34, los niveles de mRNA de p19 aumentan proporcionalmente a la edad del ratón en la mayoría de los tejidos, exceptuando el timo y páncreas. También se analizaron los niveles de mRNA tanto de p21 y p16. Se observa que, tanto en páncreas como en timo, dos órganos donde no hay aumento de p19, sí se observa incremento de p21 y p16. Por el contrario, en cerebro y testículo se observa un aumento de p19 y p16 pero no de p21, lo cual concuerda con la expresión diferencial que tienen los distintos CKIs.

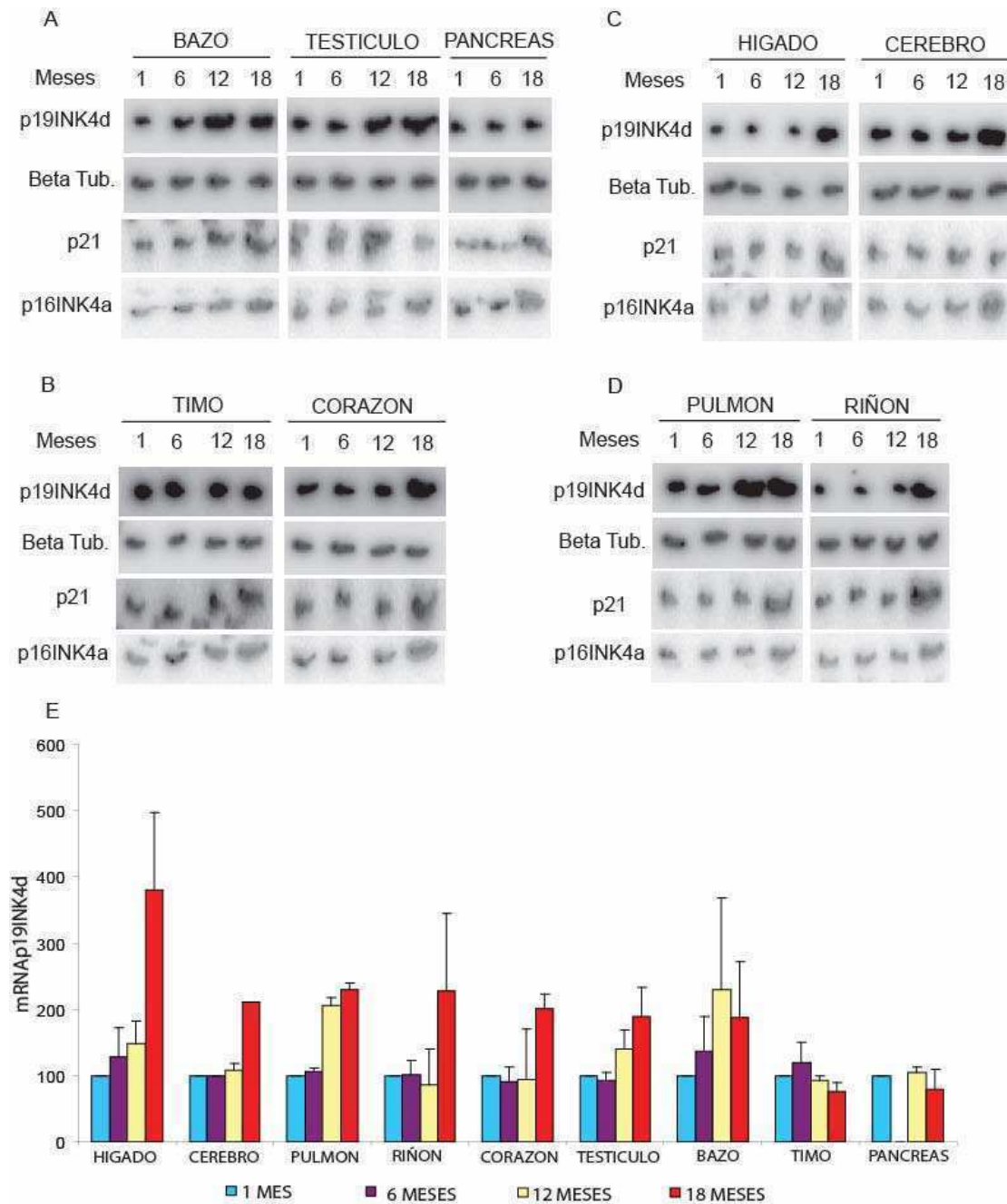


Fig. 34: (A, B, C, D) Northern Blot realizado en machos de la cepa de ratones (CF-1) de distintas edades (1 Mes, 6 Meses, 12 Meses, 18 Meses) a partir de los cuales se procedió a la extracción de los siguientes tejidos: testículo, cerebro, bazo, timo, páncreas, riñón, pulmón, corazón e hígado. Se extrajo el mRNA total de cada órgano y por northern blot se analizó la expresión de p19, p16 y p21. (E) cuantificación de la expresión de p19 realizada a partir de cuatro ratones de cada edad, los valores de p19 fueron relativizados al ratón de 1 mes, el cual fue considerado el 100%. Las barras representan la media \pm D.E. de cuatro ratones diferentes para cada edad.

En concordancia con los resultados obtenidos por northern blot, los niveles proteicos de p19 aumentan con la edad en la mayoría de los tejidos, exceptuando el hígado. Según la magnitud de la inducción podemos dividir a los órganos en dos grupos. Aquellos en los que la expresión de p19 está aumentada más de dos veces (corazón testículo, bazo y

cerebro) y otro grupo en los que la expresión de p19 está aumentada pero este aumento es menor a dos veces (pulmón, riñón y páncreas).

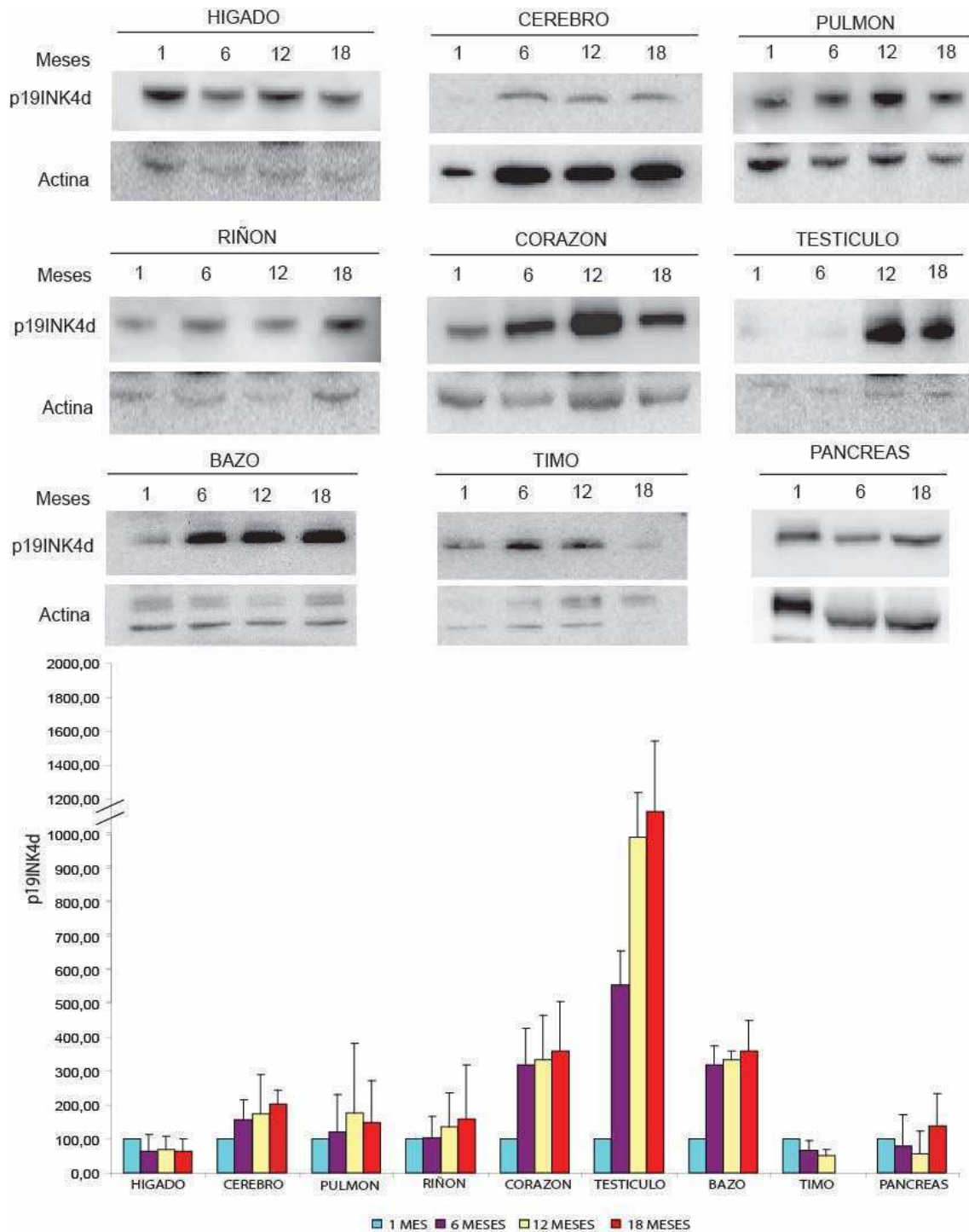


Fig. 35: Western blot realizado en machos de la cepa de ratones (CF-1) de distintas edades (1 Mes, 6 Meses, 12 Meses, 18 Meses) a partir de los cuales se procedió a la extracción de los siguientes tejidos: testículo, cerebro, bazo, timo, páncreas, riñón, pulmón, corazón e hígado. Se extrajeron las proteínas totales de cada órgano y por western se analizó la expresión de p19. (E) cuantificación de la expresión de p19 realizada a partir de cuatro ratones de cada edad. Los valores de p19 fueron relativizados al ratón de 1 mes, el cual fue considerado el 100%. Las barras representan la media \pm D.E. de cuatro ratones diferentes para cada edad.

Graficando los datos según los niveles de expresión p19 en cada edad se observa una tendencia global, independientemente del tejido, que muestra como el nivel del mRNA y la proteína p19 aumenta con la edad del organismo.

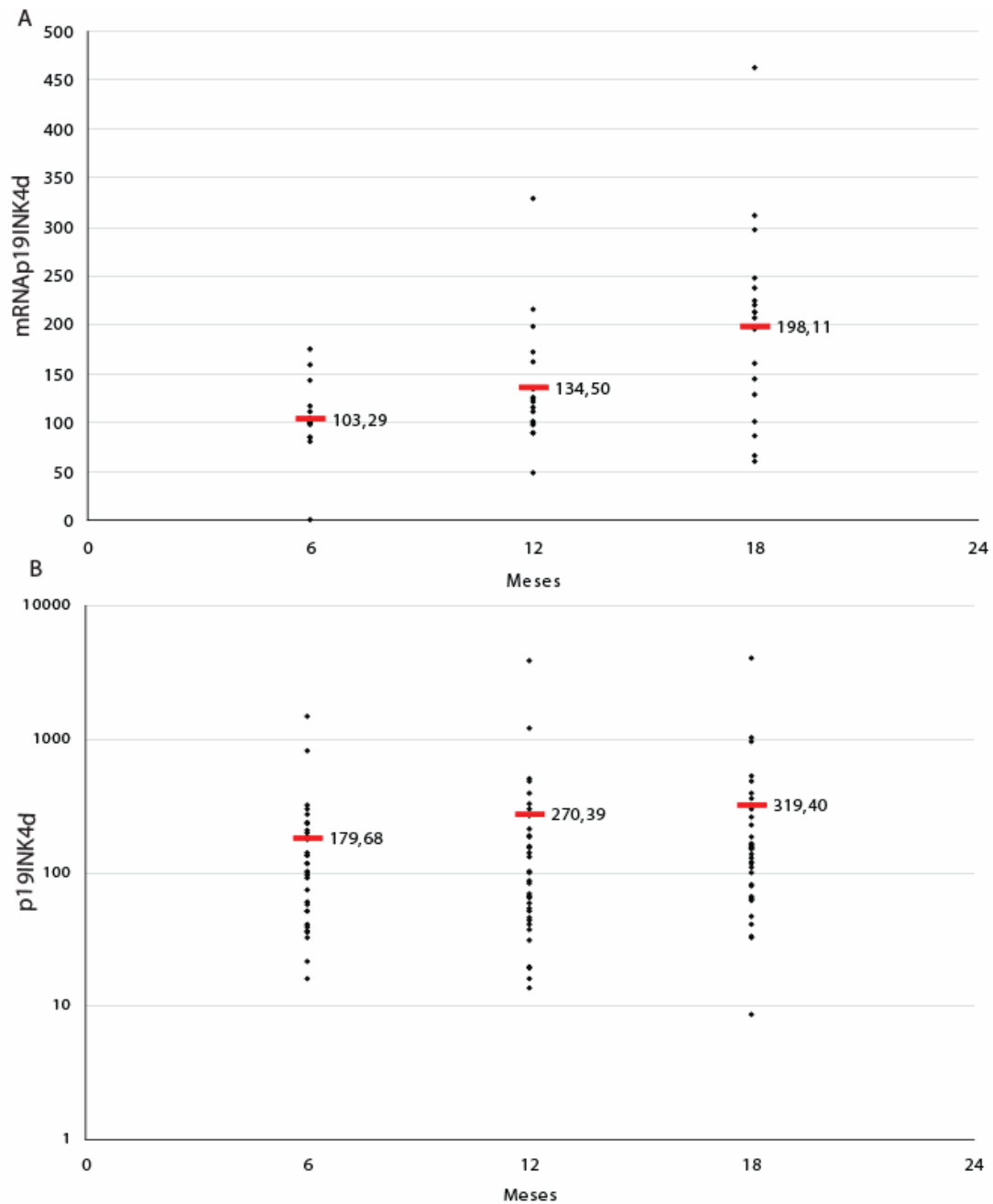


Fig. 36: (A) Resultados de northern blot (B) resultados de western blot. Gráficos que muestran la tendencia de cómo los niveles de expresión de p19 aumentan en relación a la edad del organismo. Los valores de p19 fueron relativizados al ratón de 1 mes.

Estos resultados indican que la inducción de p19 observada durante el establecimiento del estado de senescencia no se limita solamente a los modelos de cultivos celulares utilizados, sino que también hay una correlación entre el aumento de expresión de p19 y el envejecimiento de un mamífero.

DISCUSIÓN

Inducción de p19 en respuesta a distintos tipos de senescencia: ¿supresor tumoral encubierto?

El cáncer es uno de los mayores desafíos que deben enfrentar los organismos superiores con tejidos renovables, ya que los mismos al estar compuestos por células en continua proliferación corren el riesgo de sufrir una transformación maligna (Hanahan and Weinberg, 2000).

El peligro que representa el cáncer para los organismos con tejidos renovables fue mitigado durante la evolución por el desarrollo de mecanismos supresores de tumores, de los cuales la senescencia forma parte de ellos causando el arresto irreversible del ciclo celular y, en consecuencia, impidiendo el crecimiento de células tumorales (Braig and Schmitt, 2006; Sager, 1991). En este contexto la senescencia representaría un mecanismo beneficioso para los organismos dado que los protegería del cáncer.

Por otro lado la senescencia contribuiría con la pérdida de la capacidad regenerativa de los tejidos *in vivo* de modo que la regeneración y reparación tisular se van deteriorando con la edad. En este contexto la senescencia celular es considerada deletérea dado que esta involucrada en la disminución de la renovación y función tisular.

En este trabajo demostramos por primera vez la inducción de la expresión de p19 en respuesta al mecanismo senescencia. Esto fue demostrado en varios tipos celulares tanto humanas (WI-38, HEK293) como de ratón (BHK-21, MEFs). La inducción de p19 fue observada tanto en senescencia inducida por estrés genotóxico como en senescencia fisiológica por lo cual el aumento no se limita a un solo tipo de inductor.

Los niveles aumentados de p19 se correlacionaron directamente con la aparición de los distintos marcadores de senescencia como el arresto irreversible del ciclo celular, el aumento de la actividad β -galactosidasa, la expresión aumentada de p16 y p21, la aparición de foci de heterocromatina SAHF, entre otros.

Pudimos establecer una asociación directa entre el estado de senescencia y la participación de p19 dado que, sobreexpresando p19, se observó un aumento significativo en uno de los marcadores de senescencia, la SA- β GAL+. Por otro lado, al disminuir los niveles de p19 se observó un retraso en el arresto del ciclo celular en respuesta al tratamiento con el genotóxico.

Si bien la mayoría de los miembros de la familia CKI han sido involucrados en los mecanismos de senescencia (Alcorta et al., 1996; Noda et al., 1994; Palmero et al.,

1997; Stein et al., 1999), este es el primer reporte que demuestra la asociación directa entre la activación de la senescencia y la inducción de p19.

La proteína p19 no es considerada un supresor tumoral (Ortega et al., 2002) dado que los ratones p19^{-/-} no desarrollan tumores ni desórdenes proliferativos (Zindy et al., 2000). Sin embargo, los distintos CKI poseen redundancia de función (Grana et al., 1998).

La redundancia de función se ve especialmente reflejada al comparar el fenotipo de ratones *knockout* para uno o más de un CKI. Por ejemplo, la predisposición al cáncer es mucho mayor cuando falta la expresión de varios CKI que cuando falta sólo uno de ellos (Kiyokawa et al., 1996; Ortega et al., 2002; Pantoja and Serrano, 1999). Dilucidar los mecanismos de acción de cada CKI (parcialmente redundante) es uno de los puntos pendientes de comprensión en la regulación del ciclo celular debido a la compensación observada entre los miembros de ambas familias (Carbone et al., 2007).

En un trabajo recientemente publicado (Morishita et al., 2011) se analizó la relación entre la expresión de p19 y la progresión del carcinoma hepatocelular (HCC). En este trabajo observaron que la pérdida de expresión de p19 está asociada a un mal pronóstico de la enfermedad. Se analizaron características clínico-patológicas en 81 casos de los cuales, 51 correspondían a HCCs y observaron que no sólo hay una pérdida de expresión de p19 asociada al HCC, sino que también esta disminución en la expresión se asocia a HCCs poco diferenciados. Estos resultados sugieren que la expresión de p19 serviría como un marcador asociado al pronóstico de la enfermedad.

Por otro lado se demostró que inhibidores de las HDAC (*histone deacetylase*), los cuales están siendo extensamente estudiados por su función como potentes agentes quimioterapéuticos y quimiopreventivos, inducen la expresión de p19 y p15 causando arresto del ciclo celular (Hitomi et al., 2003; Yokota et al., 2004). Yokota y colaboradores demostraron que utilizando TSA o butirato (HDACi) se induce la expresión de p19 en células humanas Jurkat (proveniente de una leucemia linfocítica aguda de células T) que no expresan p16 (Yokota et al., 2004). Los HDACi aumentan la actividad del promotor e inducen la expresión del mRNA y la proteína de p19, lo que resulta en la activación de Rb y en consecuencia el arresto del ciclo. Estos resultados cobran gran importancia ya que p19 y p15 son genes que por lo general no se encuentran mutados en cánceres humanos (Roussel, 1999), por lo que la inducción de estos genes en respuesta al tratamiento con HDACi les permitiría funcionar en reemplazo de p16 en aquellos tumores en los que esta proteína se encuentra inactivada.

De esta manera los miembros de la familia INK4 constituyen blancos moleculares importantes para la prevención del cáncer (Matsuzaki and Sakai, 2005)

De acuerdo con los resultados expuestos, se observó que los HDACi inducen senescencia (Ogryzko et al., 1996), el mecanismo por el cual se activa este proceso es poco comprendido y un tanto paradójico dado que los HDACi promueven la relajación de la cromatina, lo cual resulta contradictorio porque un mecanismo por el cual se plantea la irreversibilidad del proceso de senescencia, es consecuencia de la heterocromatinización global del ADN. Sin embargo comprender esta paradoja tiene una gran importancia por el rol prometedor que tienen los HDACi en el tratamiento de ciertos tipos de tumores.

La relación directa que observamos entre la inducción del mecanismo de senescencia y el aumento en la expresión de p19, sumado a la disminución en su expresión asociada al desarrollo de carcinoma hepatocelular que observaron Morishita y col. y la expresión aumentada en respuesta al tratamiento con inhibidores de las HDAC en células que no expresan p16 (Yokota et al., 2004). Sugieren que p19 puede ser un candidato a ser un supresor tumoral. Sin embargo, esta función se encuentra “encubierta” por la redundancia de función que poseen los miembros de su familia.

Inducción de p19 asociada al establecimiento y mantenimiento de la senescencia: ¿es un marcador temprano de este estado?

La mayoría de las células senescentes presentan notables cambios en la expresión génica especialmente en los genes asociados a la activación e inhibición del ciclo celular (Jackson and Pereira-Smith, 2006; Zhang et al., 2003). p16INK4a y p21CIP1 tienen una expresión aumentada en senescencia (Braig and Schmitt, 2006; Campisi, 2001) siendo considerados biomarcadores de este proceso (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Estos CKIs forman parte de las vías de señalización gobernadas por los supresores tumorales p53 y pRb. Ambas vías de señalización pueden establecer y mantener el arresto del ciclo en senescencia. p21 es inducida por p53 y junto a p16 mantienen activada a pRb en su forma hipofosforilada (Jackson and Pereira-Smith, 2006).

Es importante destacar que p19 se indujo de manera simultánea a p16 y p21, existiendo una correspondencia temporal con la inducción de estos genes. Esto sugiere que la inducción de p19 es un evento que ocurre tempranamente en respuesta a un estímulo que dispara la senescencia. Por otro lado, los niveles de p19, al igual que los de p16 y

p21, se mantienen elevados al menos hasta las 72 h de tratamiento con el genotóxico y el último pasaje analizado en MEFs, sugiriendo la participación de p19 en el mantenimiento y establecimiento de la senescencia. Por otro lado, también observamos que los niveles de inducción de p19 se mantuvieron elevados hasta al menos seis días en los cuales las células fueron mantenidas en medio normal posterior al tratamiento con CPT 20 nM. Todos estos datos sugieren que p19 participaría en el establecimiento y el mantenimiento del estado senescente.

Regulación transcripcional del aumento de p19 y vías de señalización involucradas en su activación

De acuerdo a los experimentos de *run on* y los obtenidos con genes reporteros, realizados en ambos tipos de senescencia, observamos que la inducción de p19 esta dada a nivel transcripcional. Con este ensayo pudimos observar no solo el aumento en la actividad del promotor sino que el efecto de ambos inductores es aditivo.

Al analizar los factores involucrados en el aumento de la actividad del promotor observamos que para senescencia genotóxica la respuesta depende del factor de transcripción E2F. Sin embargo, en senescencia fisiológica se observó que E2F no interviene en la regulación de p19. Estos resultados en conjunto sugieren que la inducción de p19 en senescencias genotóxica y fisiológica irían por vías de señalización diferentes.

Profundizando los estudios sobre el promotor de p19 determinamos que entre las posiciones -500 y -250 se localizan elementos necesarios para el aumento de su actividad transcripcional en respuesta a la senescencia fisiológica. A partir de un análisis *in silico* de la región promotora del gen de p19 que comprende las posiciones -500 y -250 se destaca la presencia de dos elementos de unión para el factor de transcripción Sp1. Estos elementos poseen una similitud, con la secuencia consenso para Sp1, del 89 y 95 %. La presencia de estos elementos resulta de especial interés debido a que Sp1 está involucrado en senescencia, dado que activa la expresión de p16, (Rayess et al., 2011; Wu et al., 2007) y, además, activa la expresión de p19 en respuesta al tratamiento con los HDACi, como se mencionó anteriormente (Yokota et al., 2004). Estas evidencias sugieren que el factor Sp1 podría intervenir en la activación de p19 en respuesta a senescencia fisiológica.

Por otro lado, al analizar las vías de señalización involucradas en el aumento de la expresión de p19 en respuesta a senescencia, pudimos determinar la participación de la vía relacionada a la respuesta general al daño, es decir la vía ATM/ATR--Chk1--p53.

En nuestro laboratorio hemos demostrado que E2F1 induce la expresión de p19 en respuesta a un estímulo genotóxico (Carcagno et al., 2009). Dado que ATM fosforila y estabiliza a E2F1, esta podría ser la conexión con la vía de señalización mencionada.

También demostramos que p38 esta involucrada en la inducción de p19 en ambos tipos de senescencia. Distintos trabajos confirman que p38 (una quinasa activada por estrés) esta involucrada en senescencia, dado que su inhibición retrasa o impide la activación de este mecanismo, en particular, la senescencia inducida por estrés oxidativo (Ishikawa, 2003; Iwasa et al., 2003; Wang et al., 2002). El rol de p38 ha sido extensamente estudiado y se observó que en senescencia, esta proteína, fosforila y activa al factor de transcripción Ets. Este factor de transcripción se une al promotor de p16 e induce su expresión (Rayess et al., 2011). Recientemente se demostró que, en senescencia, p38 activa al factor de transcripción Sp1.

Una posible hipótesis que surge a partir de estos resultados es que en senescencia fisiológica p38 induzca la expresión de p19 a través de la activación del factor de transcripción Sp1. En este trabajo advertimos que ambos tipos de senescencia inducen la expresión de p19 por intermedio de las mismas vías de señalización. Sin embargo, estas vías no convergen en la activación de un mismo factor de transcripción.

Localización subcelular de p19 en respuesta a la activación de la senescencia

La alteración de la estructura de la cromatina es un fenómeno asociado al proceso de senescencia y, como se dijo anteriormente, se cree que dicha alteración esta relacionada con la irreversibilidad de este estado. La formación de SAHF contribuye al silenciamiento de genes con funciones asociadas a la progresión del ciclo celular, como por ejemplo genes blanco de E2F (Narita et al, 2003; Zhang, R., Chen, W. & Adams, P. D, 2007; Funayama, R. & Ishikawa, F., 2007).

La formación de los SAHF depende de la relocalización dinámica de muchos componentes presentes en núcleo. Es así que HP1 en sus tres isoformas (α , β y γ) está distribuida por todo el nucleoplasma en células humanas proliferantes. Sin embargo, en células senescentes la isoforma γ es la única que se fosforila y esta modificación post-traducciona es necesaria para su unión a los SAHF (Adams, 2007; Zhang et al., 2007).

La vía de señalización p16-Rb es la involucrada en la formación de SAHF. p16 mantiene a Rb en su forma activa la cual se une a SUV39H1, una histona metiltransferasa, y a HP1 promoviendo el silenciamiento (Adams, 2007; Narita et al., 2003).

En este trabajo demostramos que p19 experimenta una relocalización subcelular en respuesta a un estímulo senescente. Esta proteína transloca al núcleo y se une fuertemente a la cromatina, en particular, a la fracción correspondiente a la heterocromatina. Además, cuando se realizó la extracción de los componentes que se encuentran en forma soluble, observamos que el patrón de localización de p19 es similar al de γ HP1. Si bien estos resultados constituyen evidencias indirectas, sugieren un posible rol de p19 en la modificación de la estructura de la cromatina asociada a la senescencia.

Aumento de la expresión de p19 en ratones de distintas edades

En la última parte de la tesis hemos obtenido resultados que correlacionan el aumento en los niveles de expresión de p19, mRNA y proteína, en la mayoría de los tejidos en función de la edad de los ratones analizados. El páncreas y el timo son dos de los tejidos donde no se observó aumento de p19 con la edad. Llamativamente, en estos dos tejidos hubo un claro aumento de p16 y p21.

Zindy y colaboradores, al analizar los niveles de expresión de p19 en diferentes tejidos de ratón observaron que p19 se expresa mayoritariamente en el sistema nervioso central y en testículo (Zindy et al., 1997; Zindy et al., 2000). En este trabajo no sólo observamos el aumento de p19 en estos tejidos, sino que el mismo está directamente relacionado a la edad del organismo. Por otro lado, en estos tejidos se observó el aumento de p16 mientras que p21 se mantuvo en sus niveles basales. Este resultado concuerda con la expresión diferencial que tienen los distintos CKI en los diferentes tejidos (Zindy et al., 1997).

Hay suficientes evidencias que correlacionan una disminución de la fertilidad masculina con la edad (Baird et al., 2005; Desai et al., 2010). Para explicar este fenómeno, en los últimos años se ha puesto la mirada en los mecanismos de senescencia. Se sugiere que el aumento en las especies reactivas de oxígeno (ROS) que ocurre con la edad, contribuiría a la acumulación de macromoléculas dañadas (ADN nuclear, ADN mitocondrial, lípidos y proteínas) afectando funciones celulares y tisulares, eventos que

comúnmente están asociados con la senescencia y el envejecimiento. El rol fisiológico y patológico del aumento de ROS en los órganos reproductivos masculinos está bien definido. Se observó un aumento significativo de los mismos, en hombres mayores de 40 años (Cocuzza et al., 2008) (Agarwal et al., 2008). En un trabajo reciente en el que usaron ratones transgénicos que tenían sobreexpresado el locus p16ink4a/Arf/p15ink4b observaron el impacto global de dicha sobreexpresión en el envejecimiento. Estos ratones tenían, dependiendo del tejido, una expresión de p16 aumentada entre 2 a 20 veces. Sorprendentemente el primer fenotipo advertido fue que los ratones machos eran completamente estériles. Al analizar los testículos y la producción de espermatozoides observaron un claro impacto negativo de la sobreexpresión de p16ink4a/Arf, dado que tenían testículos más pequeños y menor cantidad de espermatozoides. Histológicamente estaban desprovistos de espermatogonias (células madre que dan origen a los espermatozoides) y solo presentaban células de Sertoli (Matheu et al., 2009). Estos resultados en conjunto, sumados al drástico aumento de la expresión de p19 observada en testículo en correlación a la edad del ratón, sugieren que puede existir una relación causal entre el aumento de p19, la inducción del mecanismo de senescencia y una disminución en la fertilidad masculina asociada al envejecimiento.

También se observó un aumento del transcripto y la proteína de p19 en cerebro correlacionado con la edad de los ratones. Al analizar el mRNA de p16 y p21 se observó solo el incremento de p16, manteniéndose p21 en sus niveles basales. Se ha reportado que p19, junto a p27, están involucradas en el mantenimiento del estado post-mitótico de las neuronas en el cerebro (Zindy et al., 1999). En animales con deleciones para p19 y p27 se observó que las neuronas terminalmente diferenciadas re-entraban al ciclo, se dividían y morían por apoptosis (Zindy et al., 1999). Un trabajo, recientemente publicado, demostró que p16 está involucrada en la disminución de la neurogénesis. El aumento de p16, asociado a edad de los ratones, afecta la función de los progenitores neuronales en la zona subventricular del cerebro (Molofsky et al., 2006). Los ratones p16^{-/-} rescataban parcialmente el fenotipo observado en esta zona del cerebro. Estos resultados sumados a la inducción y la función de p19 observada en cerebro, y que dicha inducción es directamente proporcional a la edad del ratón, sugieren que esta proteína podría estar involucrada en los mecanismos de senescencia que producen una disminución en la capacidad regenerativa en el cerebro.

Como se dijo anteriormente, el envejecimiento en mamíferos está directamente asociado con una capacidad regenerativa reducida en tejidos debido principalmente, a la

inducción de senescencia en las células progenitoras. Como consecuencia los tejidos exhiben una capacidad reducida de la reparación y una mayor incidencia de enfermedades degenerativas.

Modelo propuesto

En base a los resultados obtenidos se planteó el siguiente modelo de activación de p19 en respuesta al mecanismo de senescencia.

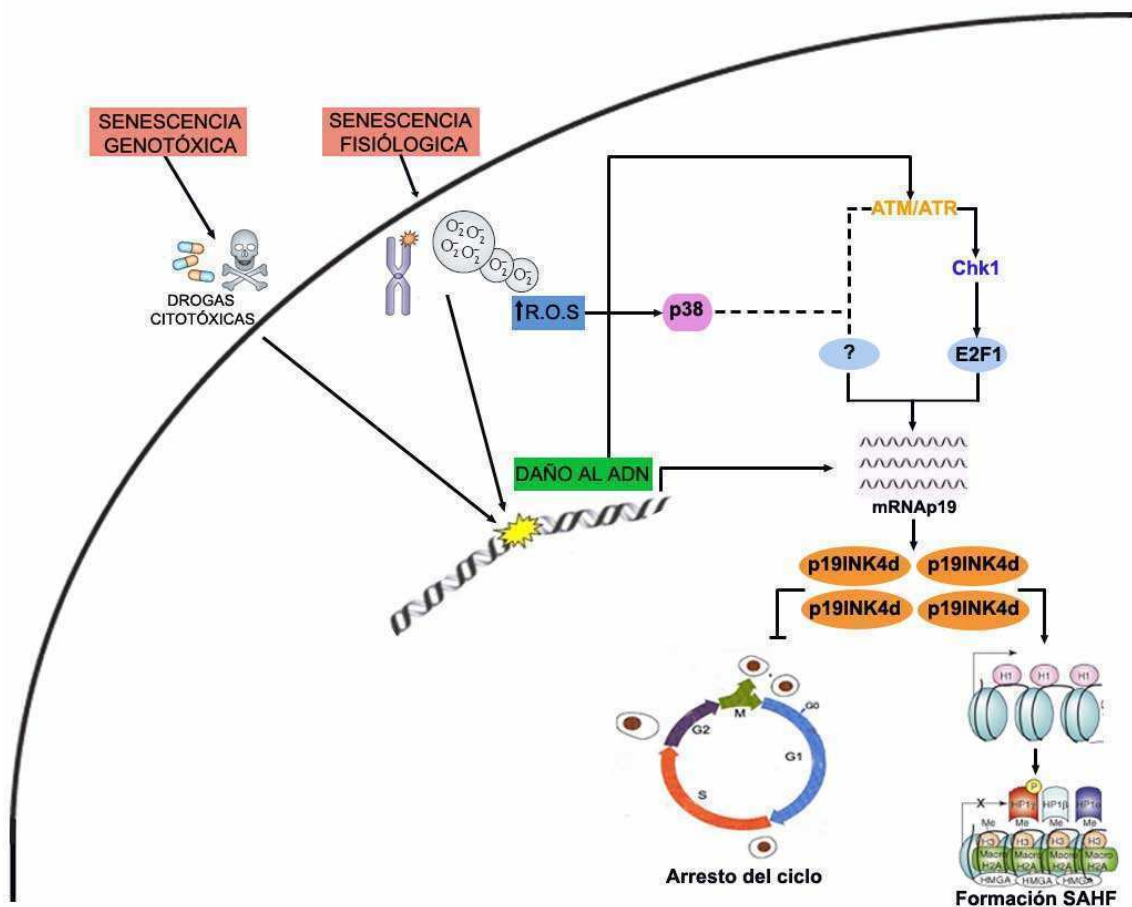


Fig. 37: Activación de p19 en respuesta al mecanismo de senescencia: frente a un estímulo senescente que culmina dañando el ADN, las células estimulan la DDR. Se activan las quinasas ATM/ATR, fosforilando a su blanco molecular Chk1, la cual es necesaria para la inducción de p19. ATM fosforila y activan la expresión de E2F y en consecuencia se induce la expresión de p19 dependiente de E2F. Por otro lado p38 es necesaria para la inducción del mRNA de p19, probablemente actuando

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo de líneas celulares

1.1 Medios de cultivo y células utilizadas

Las líneas celulares utilizadas fueron WI38 y HEK293 (derivadas de fibroblastos humanos), BHK-21 proveniente de riñón de hamster (*Mesocricetus auratus*) y MEFs (fibroblastos embrionarios de ratón). Las mismas fueron cultivada en botellas T-25, T-75 (TRP) y placas de 10 cm de diámetro en monocapas y mantenidas en medio D-MEM (GIBCO) conteniendo 10% de suero fetal bovino (SFB), L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, bicarbonato de sodio 1,5 g/l, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml, a 37 °C y en atmósfera de aire con 5% de CO₂. Las células fueron repicadas por tripsinización con una solución de tripsina 0,25%, EDTA 0,53 mM (GIBCO) y resuspendidas en medio fresco. Se determinó el número y viabilidad como se indica mas abajo.

1.2 Obtención de MEFs

Se utilizó la cepa de ratón CF-1. Hembras de 13,5-14,5 días de preñez fueron sacrificadas por dislocación cervical. Se realizó la disección en la zona abdominal y se extrajo el útero conteniendo a los embriones. Los mismos fueron separados de la placenta y saco embrionario. Posterior a esto, a cada embrión se le extirpó la cabeza y órganos rojos. El resto fue procesado con bisturí y colocado en 1 ml de tripsina 0,25% EDTA 0,53 mM e incubado a 37 °C por 20 min. Una vez obtenida una suspensión celular homogénea se colocaron 12 ml de medio de cultivo DMEM conteniendo 10% de SFB, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, bicarbonato de sodio 1,5 g/l, (sin antibióticos) a 37 °C y se incubaron en atmósfera de aire con 5% de CO₂.

1.3 Determinación del número de células y su viabilidad

Para la determinación del número de células y su viabilidad se empleó el método de exclusión del azul tripán. Se colocaron 50 µl de la suspensión celular en 30 µl de medio y 20 µl de la solución de azul tripán 4% (azul tripán 400 mg, NaCl 810 mg, K₂HPO₄ 60 mg y metil-p-hidroxibenzoato 50 mg a pH 7,4, en PBS). Se colocó una gota de esta mezcla en una cámara de Neubauer y se efectuó el recuento celular (N) al microscopio óptico en los cuatro cuadrantes de la cámara entre los 5 y los 10 minutos luego del agregado del colorante. El número de células totales por ml y el porcentaje de viabilidad se calcularon aplicando las siguientes fórmulas:

$$\text{Células/ml} = (\text{N}/4) \times 1.000 \times 2 \times 10$$

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{células no teñidas}}{\text{células totales}} \times 100$$

1.4 Generación de líneas estables para p19INK4d

Las transfecciones se llevaron a cabo con el reactivo Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Células BHK21, fueron plaqueadas en pocillos de 3 cm para llegar a 90% de confluencia en el momento de la transfección. Las mismas fueron transfectadas con 2 µg del plásmido de expresión pMTCB (vacío), ó pMTCBp19S ó pMTCBp19AS que expresan la proteína p19INK4d salvaje y la secuencia antisentido respectivamente, río abajo del promotor del gen de la metalotioneína, inducible con zinc. Además, el vector pMTCB confiere a las células resistencia al antibiótico geneticina (G418). Cuarenta y ocho horas luego de la transfección, las células fueron tripsinizadas, diluidas y sembradas en placas de 10 cm con medio fresco conteniendo 200 µg/ml de geneticina (Sigma). La presión de selección se mantuvo durante 2 semanas cambiando el medio cada 4 días. Los clones de células resistentes fueron aislados y crecidos hasta tener una cantidad de células suficiente para analizar la expresión (incremento o inhibición, según el caso) del gen de p19 mediante northern blot y western blot, en ausencia o en presencia de zinc.

2. Actividad β-galactosidasa asociada a senescencia (SA β-Gal)

Las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X y fijadas por 5 min con formaldehído 3% a temperatura ambiente. Luego lavadas dos veces con PBS e incubadas por 16 h a 37 °C (sin CO₂) con la solución de tinción. *SA-β-Gal staining solution*: 1mg de 5-bromo-4-cloro-indolil β-D-galactosidasa (X-Gal) por ml (stock=20 mg de dimetilformamida por ml)/ ácido cítrico 40 mM /fosfato de sodio, pH=6.0/ ferrocianuro de potasio 5mM / ferricianuro de potasio 5 mM / NaCl 150mM / K₂Cr₂O₇ 2 mM (Dimri et al., 1995).

Pasadas las 16 h, las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X y observadas en el microscopio invertido IX70 Olympus Fluoview y las imágenes adquiridas con una cámara digital Zeiss AxioCam.

3. Incorporación de ³H-timidina.

Las células se sembraron en pocillos de 3 cm a razón de 2×10^5 células pocillo con medio completo, suplementado con 10% de suero fetal bovino. Inmediatamente luego del tratamiento correspondiente, las células fueron incubadas con 1 $\mu\text{Ci/ml}$ ³H-timidina (81 Ci/ mmol; Amersham Biosciences) durante 6 horas a 37 °C. Luego las células fueron lavadas 3 veces con PBS frío, cosechadas y centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos. Posteriormente fueron lisadas con 500 μl de TCA 5% por 30 minutos y centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. El pellet fue lavado dos veces con agua fría y resuspendido en 50 μl de NaOH 1 M durante toda la noche. La radioactividad incorporada fue cuantificada en un contador de centelleo. La incorporación de ³H-timidina al DNA fue estimada como dpm/ μg de proteína.

4. Ensayo de cese de proliferación por recuento de células

Las células fueron plaqueadas en cajas de seis pocillos de 3,5 cm de diámetro a una densidad de 10.000 células por pocillo. Posterior a esto se realizaron los tratamientos que se indican en cada experimento. Luego las células fueron fijadas con formaldehído 10% por 15 min. a temperatura ambiente y teñidas con el colorante cristal violeta (5 mg/ml en etanol) por 15 min. Este colorante tiene la capacidad de penetrar en los núcleos celulares de manera que puede establecerse una relación directa, entre el número de células viables y la cantidad de cristal violeta fijado. Posterior a la tinción se realizaron extensos lavados para extraer el colorante residual y se dejaron secar las placas por 24 h. Luego se solubilizó el colorante con ácido acético 10% y se cuantificó a 595 nm como medida relativa del número de células (Quereda et al., 2007).

5. Preparación de plásmidos

5.1 Obtención de bacterias competentes

Las bacterias competentes se prepararon según una variante del método de Cohen (Cohen et al., 1972), descrita por Sambrook y Russell (Sambrook et al., 2001). Brevemente, se inocularon 2 ml de medio LB líquido (extracto de levadura 5 g, peptona 10 g, NaCl 5 g, agua c.s.p 1 litro) con bacterias *Escherichia coli*, cepa DH5 α , y se incubaron con agitación constante a 37 °C, durante toda la noche. Luego se diluyó el cultivo a 50 ml con medio LB y se incubó a 37 °C con agitación, hasta que alcanzó la fase exponencial de crecimiento ($\text{DO}_{600} = 0,35-0,4$). Se enfrió el cultivo en hielo y se

centrifugó a 5.000 x g durante 5 minutos. El pellet de bacterias fue resuspendido en 10 ml de CaCl₂ 60 mM frío y se mantuvo en hielo durante 30 minutos. Se centrifugó a 5.000 x g y el pellet celular se resuspendió en una solución de CaCl₂ 60 mM, glicerol 15%. Las bacterias competentes se alicuotaron y almacenaron a -70 °C.

5.2 Transformación de bacterias competentes

Una pequeña cantidad de DNA plasmídico (50-100 ng) se incubó con 50-100 µl de bacterias en hielo durante 45 minutos. A continuación las bacterias fueron sometidas a un *shock* térmico a 42 °C durante 2 minutos, seguido de un enfriamiento rápido en baño de agua con hielo. Luego se agregó LB hasta completar un volumen de 1 ml y se incubó durante 45 minutos a 37 °C. Las bacterias se centrifugaron y se resuspendieron en 50 µl de sobrenadante. Se sembraron en placas de Petri con LB agar 1,5% con ampicilina (100 µg/ml). Se incubaron 16 horas en estufa a 37 °C.

5.3 Preparación de plásmidos en baja escala (miniprep)

Los plásmidos fueron preparados utilizando el kit de minipreparación plasmídica Wizard Plus (Promega). Las bacterias transformadas con el plásmido a aislar fueron inoculadas en 3 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) e incubadas durante 16 horas a 37 °C en agitación. Una vez obtenido el pellet bacteriano, se prosiguió con la extracción plasmídica según las instrucciones del fabricante.

5.4 Preparación de plásmidos en gran escala (maxiprep)

Los plásmidos fueron preparados utilizando el kit de maxipreparación plasmídica Wizard Plus (Promega). Las bacterias transformadas con el plásmido a aislar, fueron inoculadas en 500 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml) e incubadas durante 16 horas. Una vez obtenido el pellet bacteriano, se prosiguió con la extracción plasmídica según las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron preparaciones de concentración 0,7- 1 µg/ml.

5.5 Análisis de las preparaciones plasmídicas

Con el objeto de determinar la calidad y concentración de las preparaciones, estas fueron sembradas con un buffer de siembra 6X (azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30%) en un gel de agarosa 0,8-1% en buffer TAE (Tris- acético 0,4 M, EDTA 1 mM) y resueltas en una electroforesis de voltaje constante (5 V/cm). Terminada la corrida

electroforética, el gel fue sumergido en una solución de bromuro de etidio 0,5 ug/ml y los plásmidos visualizados con luz U.V. Paralelamente, las preparaciones plasmídicas fueron cuantificadas espectrofotométricamente:

$DO_{260} = 1$ equivale 50 $\mu\text{g/ml}$ de DNA.

$DO_{260/280} > 1,5$ indica pureza aceptable (Sambrook et al., 1989).

6. Análisis de RNA por Northern Blot

6.1 Obtención de RNA total

El RNA total fue obtenido según el método descrito previamente (Chomczynski and Sacchi, 1987), levemente modificado. Partiendo de 2×10^6 células en placas de 6 cm de diámetro, se lavaron 1 vez con PBS frío, se agregaron 700 μl de solución desnaturante D (isotiocianato de guanidina 4 M, citrato de sodio 25 mM pH 7, N-laurilsarcosina 5 %, β -mercaptoetanol 0,1 M), se homogeneizaron con micropipeta y se trasvasaron a un tubo eppendorf. Todo el trabajo se realizó sobre hielo. Se agregaron luego 50 μl de acetato de sodio 2 M pH 4.5, 400 μl de fenol saturado en agua, 90 μl de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1). La suspensión fue agitada vigorosamente durante 10 segundos con un vórtex y centrifugada durante 20 minutos a 10.000 rpm a 4 °C. La fase superior acuosa, que contiene el RNA, se trasvasó a otro tubo y el RNA fue precipitado agregando un volumen de isopropanol y dejándolo durante 1 hora a -20 °C. Se centrifugó luego a 10.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 200 μl de etanol 100%. El RNA se lavó 1 vez con 200 μl etanol 75 % y se resuspendió en 20 μl de agua estéril libre de RNasas.

La concentración del RNA se calculó midiendo la absorbancia a 260 nm ($1 OD_{260} = 40 \mu\text{g}$ de RNA) aceptando como criterio de pureza un cociente A_{260}/A_{280} mayor que 1,7 (Sambrook et al, 1989).

6.2 Electroforesis de RNA

La separación electroforética del RNA total se realizó según una adaptación del método descrito por (McMaster and Carmichael, 1977). Las muestras de RNA (20 μg) se desnaturalizaron a 50 °C durante 60 minutos en una mezcla conteniendo glioxal 1,2 M, dimetilsulfóxido (DMSO) 7,5 M, fosfato de sodio 10 mM pH 7. Luego, las muestras fueron tratadas con el buffer de siembra (glicerol 50 %, fosfato de sodio 10 mM pH 7, azul de bromofenol 0,25 % y xilene cianol FF 0,25 %) y sembradas en gel de agarosa 1 % en buffer

fosfato 10 mM. La corrida electroforética se llevó a cabo durante 2-3 horas a 100 mV en buffer fosfato de sodio 10 mM pH 7.

6.3 Transferencia de RNA a membrana

Una vez finalizada la electroforesis, el gel fue sometido a transferencia pasiva a una membrana de nylon (Hybond-N+ Amersham) según lo descrito por Sambrook y col (1989). Dicha membrana fue humedecida previamente durante 45 minutos en SSC 20X (NaCl 3 M, citrato de sodio 0,3 M pH 7). La transferencia se realizó por capilaridad ascendente en una solución de SSC 20X durante 16 horas. Luego la membrana se secó entre papeles Whatman 3 MM durante 30 minutos a temperatura ambiente y se colocó en estufa a 80 °C durante 1 hora para que el RNA se fije irreversiblemente al nylon.

6.4 Marcación de sondas

Con la finalidad de detectar los mRNA de p19^{INK4d}, b-tubulina, p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c}, p21^{CIP1}, p27^{KIP1} y E2F-1 se utilizaron oligodeoxinucleótidos complementarios al mRNA o plásmidos conteniendo el cDNA de dichos genes. Los oligodeoxinucleótidos fueron marcados radioactivamente en su extremo 5' con la enzima T4 polinucleótido quinasa. Se preparó la mezcla de reacción conteniendo 5 pmoles de oligonucleótido, buffer de reacción (provisto con la enzima), 5 U de T4 polinucleótido quinasa (Invitrogen), 100µCi de [γ -32P] ATP (6.000 Ci/mmol), en un volumen total de 30 µl. Esta preparación se incubó 1 hora a 37 °C. La sonda marcada fue purificada, para eliminar el nucleótido radioactivo no incorporado, mediante dos precipitaciones sucesivas con 1/10 del volumen de acetato de amonio 7,5 M pH 5,5 y 2 volúmenes de etanol absoluto durante 30 minutos a -20 °C. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 minutos. El precipitado fue lavado con etanol 70% y resuspendido en 100 µl de buffer TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM). Una alícuota de la sonda se colocó en un vial con líquido centellante a base de tolueno y se contó la radioactividad en un contador de centelleo líquido. Las sondas poseían una actividad específica aproximada de 4-6 x 10³ cpm/fmol.

Los plásmidos conteniendo los diferentes cDNAs, fueron linealizados por digestión con una enzima de restricción específica y se marcaron radioactivamente de forma similar a los oligonucleótidos. Posteriormente fueron purificados de manera similar a los oligonucleótidos y antes de ser agregados a las membranas fueron calentados a 95° C por 5 minutos para desnaturalizarlos. Una alícuota de la sonda se colocó en un vial con

líquido centelleante a base de tolueno y se contó la radioactividad en un contador de centelleo líquido. Las sondas así obtenidas poseían una actividad específica aproximada de $5-7 \times 10^3$ cpm/fmol.

6.5 Hibridización

Las membranas de nylon conteniendo el RNA fijado por calor fueron prehibridizadas en una solución bloqueante. La prehibridización se llevó a cabo en una solución conteniendo SSC 6X, SDS 0,1 %, Denhardt 2X (polivinilpirrolidona 0,04%, Ficoll 0,04%, seroalbúmina bovina 0,04%) y DNA de esperma de salmón 100 µg/ml durante 2 horas a 68 °C en horno de hibridización con rotación. Posteriormente, las sondas fueron agregadas a la solución y la hibridización se completó a 68 °C por 16 horas más.

Finalizado este procedimiento, las membranas fueron lavadas 3 veces a temperatura ambiente con SSC 1X y SDS 1% durante 2 minutos y tres veces a 68 °C con SSC 0,2X y SDS 0,1 % durante 2 minutos, en el caso que la sonda fuera un oligonucleótido.

Cuando la sonda era de naturaleza plasmídica, las membranas fueron sometidas a dos lavados a temperatura ambiente con SSC 2X y SDS 0,1 % durante 15 minutos y dos lavados a 68 °C con SSC 0,2X y SDS 0,1 % durante 15 minutos.

6.6 Autorradiografía y cuantificación

Las membranas lavadas se secaron entre papel Whatmman 3MM por 30 minutos, se envolvieron con nylon impermeable y se expusieron en un cassette con pantalla radiográfica intensificadora (FUJIFILM) a temperatura ambiente entre 24 y 72 horas. Luego de escanear las pantallas en un analizador de imágenes Bio-Imaging Analyzer Fujifilm BAS-1800II, las imágenes resultantes se cuantificaron con el programa ImageJ. Los resultados de los ensayos de Northern blot fueron normalizados con los valores de los niveles de mRNA de β -tubulina detectados en paralelo.

7 Análisis de proteínas por Western Blot

7.1 Preparación del lisado celular total

Aproximadamente $2-3 \times 10^6$ células, se lavaron una vez con PBS frío, se cosecharon y se pasaron a un eppendorf con 1 ml de PBS, se centrifugaron a 5000 rpm descartándose el sobrenadante. El lisado celular total fue preparado con 100 µl de buffer de

precipitación de complejos inmunes RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,5% deoxicolato de sodio, 0,1% SDS) conteniendo inhibidores de proteasas frescos (100 µg/ml PMSF, 60 µg/ml aprotinina y 1 mM ortovanadato de sodio). Luego de homogeneizar las células con el tip, se dejaron en hielo 30 minutos. El lisado fue centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos para remover los restos celulares y se guardó una alícuota del sobrenadante para cuantificar proteínas por el método de ácido bicinonínico.

En algunos casos, luego de la obtención del pellet celular, este fue directamente resuspendido en buffer de siembra 1X (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, β-mercaptoetanol 100 mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%). Previo a la siembra las muestras fueron sonicadas por 15 segundos a 40% de amplitud.

7.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida

En todos los casos las muestras fueron analizadas en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1970). Utilizamos el sistema vertical de Bio-Rad. El gel separador (inferior) se preparó al 12% (1,5 ml de agua destilada estéril, 1,6 ml de solución de acrilamida/bisacrilamida al 30%, 0,8 ml de Tris 1,5 M pH 8,8, 40 µl de SDS 10%, 40 µl de persulfato de amonio 10% y 2,5 µl de TEMED). En algunos casos el porcentaje de poliacrilamida utilizado fue del 15%. En ambos casos el gel concentrador (superior) se preparó al 5% (2,04 ml de agua destilada estéril, 0,51 ml de solución de acrilamida/ bisacrilamida al 30%, 0,37 ml de Tris 1 M pH 6,8, 30 µl de SDS 10%, 30 µl de persulfato de amonio 10% y 3 µl de TEMED). Las muestras, con el buffer de siembra, se hirvieron durante 3 minutos. En un pocillo se sembraron 5 µl del marcador de peso molecular (Full-Range Rainbow Molecular Weight Marker, Amersham Life Science). Luego se realizó la electroforesis, a 100 V, en buffer Tris-Glicina-SDS 1X hasta que el azul de bromofenol alcanzó el final del gel separador.

7.3 Transferencia a membrana

Una vez concluida la separación electroforética, las proteínas fueron transferidas a un soporte sólido, en este caso una membrana de nitrocelulosa (Burnette, 1981). Una de las caras del gel fue apoyada sobre un fragmento de membrana de nitrocelulosa (RPN303D Hybond - ECL 0,45 um GE Healthcare) del mismo tamaño y ambos fueron colocados entre papeles Whatman 3MM previamente humedecidos en buffer de

transferencia 1X y estos a su vez colocados entre dos esponjas de poro grande y dentro de un soporte plástico. Toda la construcción fue sumergida en la cuba electroforética, con buffer de transferencia 1X y con la membrana de nitrocelulosa del lado anódico. La transferencia se llevó a cabo a 200 mA, durante 60 minutos.

- *Buffer Tris-Glicina-SDS 1X*: Tris base 25 mM, glicina 250 mM pH 8,3, SDS 0,1%.
- *Buffer de Transferencia 1X*: Tris-glicina 1X, SDS 0,01%, metanol 20%.
- *Buffer de Siembra*: Tris-HCl 50mM pH 6,8, β -mercaptoetanol 100 mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%.

7.4 Detección de proteínas

Luego de la transferencia, la membrana de nitrocelulosa fue sumergida en una solución de bloqueo (leche descremada en polvo 5% en TBS 1X) y se dejó en agitación O.N. a 4 °C para reducir los sitios potenciales de unión de proteínas irrelevantes. Luego se incubó la membrana con el anticuerpo primario diluido en TBS 1X durante 3 horas a temperatura ambiente con agitación suave. La membrana se lavó 3 veces con TBS 1X Tween-20 0,05% durante 5 minutos. Luego se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con la enzima peroxidasa de rabanito (HRP) diluido en solución de bloqueo durante 90 minutos a temperatura ambiente. La membrana se lavó 3 veces nuevamente con TBS 1X Tween-20 0,05% durante 5 minutos y una vez con TBS 1X, también durante 5 minutos. Para visualizar las proteínas de interés se utilizó el kit de detección ECL (Amersham Pharmacia Biotech), basado en la producción de quimioluminiscencia como consecuencia de la digestión de un sustrato de la enzima HRP. La señal fue detectada en un analizador de imágenes Bio-Imaging Analyser Fujifilm LAS-1000.

Anticuerpos primarios utilizados:

- Anticuerpo anti-p19INK4d humana de ratón, P0999-55A, USBiological. Mouse anti-p19 (de ratón monoclonal) 37-8700 Invitrogen. p19 (MA-167) (hecho en conejo policlonal) sc-1063 santa cruz.
- Anticuerpo anti-V5, monoclonal de ratón. R960-25, Invitrogen.
- Anticuerpo anti- HP1 Gamma, (monoclonal en ratón). MAB3450 CHEMICON INTERNATIONAL.
- Anticuerpo anti Hp1 alfa, (monoclonal en ratón). ab14298 ABCAM

- Anti RNAPol 2 clon CTD4H8 (monoclonal en ratón). 05-623 Millipore.
- Anti H3 acetilada (policlonal en conejo). 06-599 Upstate.
- Anticuerpo anti- Actina (monoclonal ratón). Sc-47778 Santa Cruz.
- Anticuerpo anti-GAPDH, monoclonal de ratón. AB8245 clon 6c5, ABCAM.
- Anticuerpo anti-histona H3, policlonal de conejo. C-16 sc-8654-R, Santa Cruz Biotechnology.
- Anticuerpos secundarios utilizados:
 - Goat anti-mouse conjugado con HRP, sc-2005 (Santa Cruz).
 - Goat anti-rabbit conjugado con HRP, sc-2004 (Santa Cruz).

8. Estudio de la tasa de iniciación de la transcripción. Ensayo de “Nuclear Run on”

Para cada tratamiento se sembraron 56×10^6 células en placas de 10 cm a razón de 8×10^6 células/ placa. Al día siguiente el medio de cultivo fue reemplazado por medio fresco en MEFs de pasaje bajo y alto o conteniendo o no CPT 20 nM por 24 h en células WI-38.

8.1 Aislamiento de núcleos

Luego del tratamiento se descartó el medio de cultivo, las células fueron lavadas dos veces con PBS frío y cosechadas en dos tubos eppendorf (dos tubos por cada tratamiento) con 1 ml de PBS frío. Luego se centrifugaron durante 5 minutos a 1.500 rpm y fueron resuspendidos, ambos pellets celulares, en un tubo con 1 ml de buffer de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8,4, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,14 M NaCl). Se agregaron 4 μ l de Nonidet P40 5% y se dejó reposar 10 minutos en hielo. La ruptura celular fue verificada por observación de una alícuota al microscopio con azul tripán. Se continuó agregando alícuotas de 2 μ l de Nonidet P40 hasta que la ruptura fue mayor al 80%. Luego se centrifugaron las muestras a 1.300 rpm por un minuto para recuperar los núcleos y se descartó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados con 1 ml de buffer de lavado frío (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, M KCl 140m, $MgCl_2$ 10 mM, $MnCl_2$ 1mM, glicerol 20%, β -mercaptoetanol 14 mM).

8.2 Radiomarcación del RNA nuclear

El sobrenadante del lavado fue descartado y los núcleos fueron resuspendidos en 50 μ l de buffer de marcado (es el buffer de lisis con el agregado de 1 mM ATP, GTP y CTP, 10 mM fosfocreatina, 100 μ g/ml fosfocreatina quinasa, 0,34 μ M [α -³²P] UTP (New England Nuclear, cat. BLU507H). La mezcla de reacción fue incubada por 20 minutos a 30 °C con agitación y luego centrifugada 800 x g durante 5 minutos, descartándose el sobrenadante.

8.3 Obtención del RNA

Los núcleos fueron resuspendidos en 150 μ l de HSB frío (10 mM Tris- HCl pH 7,4, 50 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 0,5 M NaCl) y se agregaron 3 μ l de solución de DNAsa (2 mg de DNAsa en 1 ml de 0,0025 N HCl, 50% glicerol). Se pipeteó varias veces para reducir la viscosidad y se agregaron 300 μ l de buffer de detención (50 mM Tris- HCl pH 7,5 20 mM EDTA pH 8,0, 0,8 % SDS). Se añadió proteinasa K (solución 20 mg/ml en Tris-HCl 50 mM pH 8,0, 1,5 mM acetato de calcio) a una concentración final de 100 μ g/ml y se incubó por 30 minutos a 42 °C. Luego se incorporaron 450 μ l de fenol/agua, incubándose 15 minutos a 65 °C vortexeándose cada 5 minutos. Luego se agregaron 450 μ l de cloroformo/alcohol isoamílico (CHISAM), se mezcló con vórtex y las muestras fueron centrifugadas a 2.000 x g por 5 minutos, descartándose la fase orgánica. La extracción se repitió con 450 μ l de CHISAM. Posterior a la centrifugación se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf. Se adicionaron 45 μ l de LiCl 5 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto y luego se mezcló por inversión. Se realizó una centrifugación por 10 minutos a 12.000 x g y se resuspendió el pellet en 0,4 ml de agua destilada. Luego se realizó una segunda precipitación con 40 μ l de LiCl 5 M y 2,5 volúmenes de etanol. El pellet de RNA fue resuspendido en 100 μ l de agua y con una alícuota de 2 μ l se midió la actividad de la preparación en un contador de centelleo líquido.

8.4 Preparación de sondas de cDNAs

Para cada tratamiento se utilizaron 10 pmoles de los plásmidos linealizados conteniendo los cDNA de los genes a estudiar para ser utilizados como sondas frías o 10 pmoles de oligonucleótidos que conteniendo la secuencia complementaria al mRNA de los genes analizados. Los plásmidos fueron linealizados y luego purificados mediante

precipitación con dos volúmenes de etanol y un décimo del volumen de acetato de amonio 3 M. Cada sonda fue resuspendida en 20 µl de solución desnaturante (NaCl 2 M, NaOH 0,1 M), hervida por 2 minutos y se les agregaron 180 µl de SSC 6X. Las muestras de cDNA fueron sembradas en una membrana de Nylon (Hybond +), previamente humedecida en SSC 6X por 10 minutos, utilizando un dispositivo slot blot. La membrana fue lavada con 200 µl de SSC 6X, secada y cocinada durante 1 hora a 80 °C.

8.5 Hibridización

La membrana conteniendo las sondas fijadas fue incubada en solución de prehibridización (6X SSC, 5X Denhardt's, 0,5% w/v SDS, 1 µg/ml PolyA, 100 µg/ml DNA esperma de salmón) durante 6 horas a 68 °C. Agregamos la muestra de RNA marcado con [α -³²P] UTP e incubamos las membranas 72 horas o más. Luego la membrana fue sometida a dos lavados a temperatura ambiente con SSC 2X y SDS 0,1% durante 15 minutos y dos lavados a 68 °C con SSC 0,2X y SDS 0,1% durante 15 minutos y se expuso en un cassette con pantalla radiográfica intensificadora (FUJIFILM) a temperatura ambiente 72 horas. Luego de escanear las pantallas en un analizador de imágenes Bio-Imaging Analyzer Fujifilm BAS-1800II, las imágenes resultantes se cuantificaron con el programa ImageJ.

9. Determinación de la actividad transcripcional del promotor de p19INK4d

9.1 Transfección de células en cultivo

El día previo a la transfección las células fueron tripsinizadas y plaqueadas en cajas de seis pocillos de 3,5 cm de diámetro a una densidad de 5×10^5 células por pocillo en 2,5 ml de medio. Al día siguiente y cuatro horas antes de la transfección, el medio fue reemplazado por uno fresco. El DNA plasmídico fue introducido a las células mediante el método de transfección transitoria con Polyethylenimine (PEI). Por cada pocillo a transfectar se preparó un tubo conteniendo 200 µl de medio (sin suero y con antibióticos) y 15 µl de PEI. A cada tubo se agregó el ADN plasmídico y se mezcló por agitación durante 10 segundos. Se dejó reposar la mezcla por 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación del precipitado y luego a cada pocillo se agregaron 200 µl de la correspondiente preparación de DNAs. Se dejó recuperar a las células en

medio completo por 16 horas a 37 °C. Al cabo de este período, las células fueron lavadas con PBS y cultivadas con 2,5 ml de medio completo. En este momento se agregaron las drogas correspondientes prolongándose la incubación por 24 h o más dependiendo del experimento. La cantidad final de DNA fue ajustada en todos los casos a 8 µg por pocillo, la que fue completada con cantidad necesaria de DNA “carrier” (DNA genómico de hígado de rata).

9.2 Preparación de extractos celulares

Las células fueron lavadas 3 veces con 2 ml de PBS frío. Luego se agregaron 1,5 ml de TEN frío (Tris 20 mM pH 8, NaCl 100 mM y EDTA 1 mM) para favorecer el despegado de las células. La monocapa celular fue cosechada en tubos eppendorf. Las células fueron centrifugadas a 1.000 x g durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue eliminado por aspiración y el pellet celular resuspendido en 200 µl de buffer Tris 250 mM pH 7,5 conteniendo glicerol 15%. Las células fueron lisadas sometiéndolas a 3 ciclos consecutivos de 5 minutos cada uno de congelamiento/descongelamiento en nitrógeno líquido y baño de agua a 37 °C, respectivamente, agitando vigorosamente cada vez. Finalmente, los tubos se centrifugaron a 1.000 x g durante 10 minutos a 4 °C para eliminar el debris celular. El sobrenadante así obtenido se dividió en dos alícuotas para la posterior determinación de actividad de β-galactosidasa y actividad de cloranfenicol acetil transferasa (CAT).

9.3 Determinación de la actividad de β-galactosidasa

La actividad de la enzima β-galactosidasa se determinó mediante un ensayo colorimétrico donde se cuantificó el sustrato cromogénico liberado por hidrólisis. La reacción se llevó a cabo en una mezcla conteniendo 50 µl del extracto, 1 ml de buffer PM2 (Na₂HPO₄ 60 mM, NaH₂PO₄ 40 mM, KCl 10 mM y MgSO₄ 1 mM), 1 mg del sustrato ortonitrofenilβgalactopiranosido (ONPG) y 0,7 µl de β-mercaptoetanol. La reacción se desarrolló a 37 °C hasta la aparición de color amarillo, aproximadamente luego de 3-4 horas. Se registró el tiempo de reacción y se midió la absorbancia a 420 nm. La actividad específica de la enzima β-galactosidasa fue calculada según: (A_{420nm} muestra - A_{420nm} control)/µl x hora.

9.4 Determinación de la actividad de Cloranfenicol acetil transferasa

La actividad de la enzima CAT fue determinada según el método descrito por Seed y Sheen (1988). El extracto celular fue previamente calentado a 65 °C durante 5 minutos, con el propósito de inactivar las acetilasas endógenas. Se enfrió inmediatamente en hielo durante 5 minutos y se centrifugó 15 minutos a 1.500 x g a 4 °C para eliminar las proteínas desnaturalizadas. La actividad CAT fue realizada en 50 µl de sobrenadante en una mezcla de reacción conteniendo Tris-HCl 100 mM pH 8, butiril-CoA 0,25 mg/ml y 200 nCi de cloranfenicol-³H (60 Ci /mmol, 0,01 mCi/ml) e incubando 120 minutos a 37 °C. La reacción fue detenida por el agregado de 200 µl de xileno. Luego de agitar vigorosamente, los incubados fueron centrifugados a 10.000 x g durante 15 minutos. Se separó la fase orgánica, la que fue sometida a una extracción reversa mediante el agregado de 200 µl de agua. Luego de agitar y centrifugar bajo las mismas condiciones, 150 ul de la fase orgánica resultante, conteniendo los derivados butirilados de cloranfenicol-³H, fue colocada en viales con liquido centellante a base de tolueno (PPO 0,4%, dimetil POPOP 0,05% en tolueno) midiéndose la radioactividad en un contador de centelleo líquido. La actividad específica de CAT se determinó como (dpm muestra - dpm control pBLCAT6)/µl x minuto. Las unidades CAT fueron normalizadas con las unidades β-gal, para ajustar los resultados de acuerdo con la eficiencia de transfección en cada caso.

10. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo

Aproximadamente 1 x 10⁶ células fueron cosechadas con 500 ul de tripsina 0,25%, EDTA 0,53 mM (GIBCO), completándose a un volumen de 10 ml con PBS. Luego, se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 minutos. El pellet celular se resuspendió en 1 ml de etanol 70% el cual fue agregado por goteo mientras la suspensión celular era agitada en vortex. Esta suspensión fue dejada toda la noche a 4 °C para completar su fijación. Las células fijadas se lavaron 2 veces con PBS y se les agregaron 5 µl de RNAsa A 10 mg/ml en PBS y 7,5 ul de ioduro de propidio 5 mg/ml en 500 ul de PBS. El contenido de DNA celular fue analizado en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA). Los datos fueron analizados con el programa WinMDI 2.8.

11. Inmunocitoquímica

Las células fueron sembradas sobre un cubreobjetos de vidrio a 40% de confluencia y dejadas en reposo 24 horas para permitir la adherencia al mismo. En los tiempos indicados en cada experimento las células fueron lavadas con PBS y fijadas con paraformaldehído 4% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego de lavar dos veces con PBS las células fueron permeabilizadas con 0,1% Triton X-100 en PBS por 5 minutos, lavadas e incubadas por 60 minutos con 2% seroalbúmina bovina (BSA). Luego las células fueron lavadas una vez e incubadas con anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas tres veces con PBS antes de incubarlas durante 1 hora con el anticuerpo secundario fluorescente a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego de lavar tres veces con PBS, los núcleos fueron teñidos con 4,6 diamidino-2-phenylindole (DAPI) (2 μ g/ul final) durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y finalmente las células fueron montadas con Mowiol 4-88 (Calbiochem).

Para eliminar las proteínas que se encuentran solubles previo a la fijación, las células fueron tratadas con el buffer CSK: NaCl 100mM, sacarosa 300 mM, PIPES 10 mM, MgCl₂ 3 mM, conteniendo Tritón X-100 0,5%, por cinco minutos y después lavadas tres veces con PBS 1X para eliminar todo lo soluble.

Los preparados fueron observados con un microscopio invertido IX70 Olympus Fluoview y las imágenes adquiridas con una cámara digital Zeiss AxioCam.

Anticuerpos Primarios empleados:

- p19 (MA-167) (hecho en conejo policlonal) sc-1063 santa cruz.
-Anticuerpo anti- HP1 Gamma, (monoclonal en ratón). MAB3450 CHEMICON INTERNATIONAL.

• Anticuerpos secundarios:

-Alexa Fluor 488 Goat anti-Mouse. A11001 Invitrogen.
-Alexa Fluor 594 Goat anti-Mouse. A11032 Invitrogen

12. Fraccionamiento subcelular y aislamiento de la cromatina

Para aislar la cromatina las células fueron resuspendidas (4×10^7 células/ml) en 500 ul de buffer A (HEPES 10 mM (pH 7,9), KCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, sacarosa 0,34 M, glicerol 10%, DTT 1 mM, cocktail de inhibidores de proteasas 200X (539134

Calbiochem), phenylmethylsulfonyl fluoride 0,1 mM) Triton X-100 (0,1%) e incubadas en hielo por 5 min. Los núcleos fueron colectados en el primer pellet (P1) por centrifugación a baja velocidad (4 min, 1.300xg, 4 °C). El sobrenadante (S1), correspondiente a la fracción citoplasmática, fue centrifugado a alta velocidad para eliminar el debris celular y agregados insolubles (15 min, 20.000xg, 4 °C). Los núcleos fueron lavados una vez con buffer A y luego lisados con 200 ul de buffer B (EDTA 3 mM, EGTA 0.2 mM, DTT 1 mM, e inhibidores de proteasas) por 30 min en hielo. El lisado nuclear se centrifugó 4 min a 1.700xg, 4 °C obteniéndose un sobrenadante (S3) el cual constituye la fracción nucleoplásmica.

El pellet (P3) fue lavado una vez con buffer B y centrifugado nuevamente en las mismas condiciones. Este pellet que constituye la fracción cromatínica fue resuspendido en buffer de siembra 1X (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, β-mercaptoetanol 100 mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%) y sonicado por 15 segundos a 25% de amplitud.

Por western blot se analizó la expresión de p19 y se confirmó la pureza de cada fracción utilizando gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como marcador de citoplasma e histona H3 total como marcador de la fracción correspondiente a la cromatina.

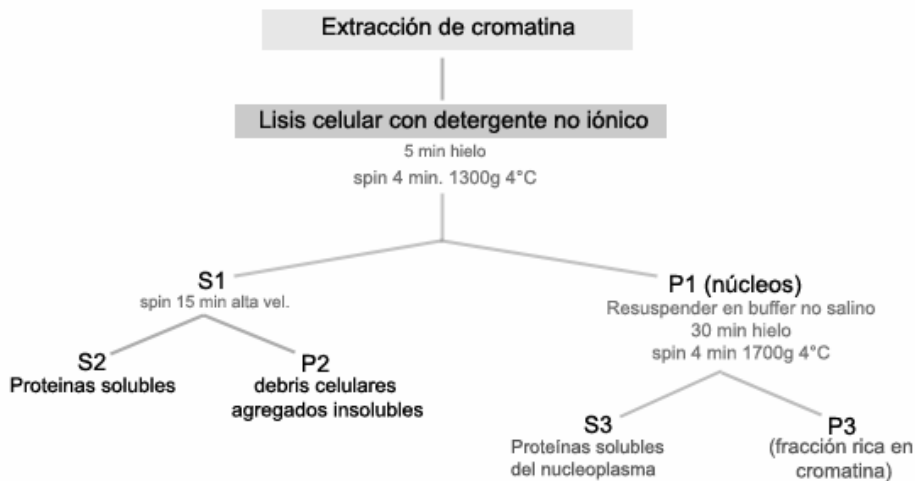


Fig. 1: Gráfico representativo que muestra esquemáticamente como fue realizado el fraccionamiento subcelular y como se obtuvieron cada una de las fracciones (citoplasma, nucleoplasma y cromatina)

13. Fraccionamiento y separación de heterocromatina y eucromatina

Las fracciones subnucleares fueron obtenidas según el protocolo de Frenster et al. (Fresner et al, 1963). Las células fueron incubadas con buffer CSK (NaCl 100 mM, sacarosa 300 mM, PIPES 10 mM, pH 6.8, EDTA 1 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 1 mM) conteniendo TritonX-100 (0,1%) y centrifugadas dos veces a 3.100 rpm por 5 min a 4 °C. El pellet nuclear resultante fue incubado en buffer I (sacarosa 0,25 M, CaCl₂ 3,3 mM) y resuspendido en 0,2 ml de buffer A (sacarosa 0,1875 M, glucosa 20 mM, Tris-HCl 24 mM (pH 7,1), NaCl 12,8mM, CaCl₂ 3,3 mM). Luego se incubó a 37 °C por 30 min y se centrifugó a 3.100 rpm por 5 min a 4 °C. Se realizaron 3 lavados con el buffer B (Tris-HCl 10 mM, pH 7,1, CaCl₂ 3,3 mM) y el pellet obtenido por centrifugación (3.100 rpm por 5 min a 4 °C), fue resuspendido en 400 ul de sacarosa 0,25M y sonicado. Se realizó una centrifugación a 1.400 rpm por 5 min a 4 °C para eliminar el debris celular. El sobrenadante fue centrifugado a 4.500 rpm por 10 min a 4 °C. El pellet resultante constituye la fracción correspondiente a la heterocromatina (H). El sobrenadante fue nuevamente centrifugado a 7.700 rpm por 30 min. a 4 °C. El pellet obtenido constituye la fracción intermedia (I). El último sobrenadante fue centrifugado a 44.000 rpm por 60 min y el pellet obtenido es el correspondiente a la fracción eucromatina (E).

Las tres fracciones (H, I, E) fueron resuspendidas en el mismo volumen de buffer de siembra 1X. Por western blot se analizó la expresión de p19 y la pureza de cada fracción utilizando la proteína α HP1 (Heterochromatin protein 1) como marcador de la fracción correspondiente a la heterocromatina y RNAPol II como marcador de eucromatina.

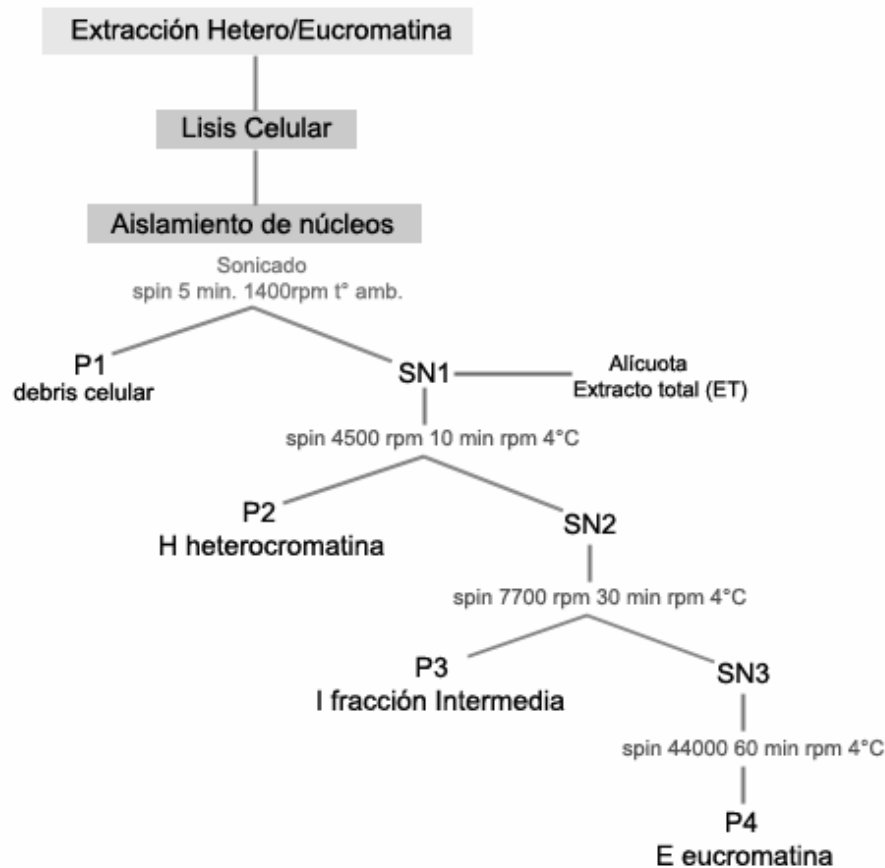


Fig. 2: Gráfico representativo del fraccionamiento subnuclear que muestra esquemáticamente como fue realizada la separación de cada una de las fracciones (heterocromatina y eucromatina)

14. Extracción de tejidos en ratones de distintas edades

Los experimentos fueron realizados en ratones machos de la cepa CF-1 de 1, 6, 12, y 18 meses de edad obtenidos del Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Los animales fueron mantenidos, a lo largo de los experimentos, en jaulas individuales con agua y comida ad libitum, bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 horas (luz a partir de las 8 a.m.) y una temperatura de 21-22 °C. Los experimentos se realizaron en concordancia con regulaciones locales y con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del NIH (Guide for Care and Use of Laboratory Animals, National Institutes of Health, publicación 80-23/96). Se hicieron esfuerzos para minimizar el sufrimiento animal y para reducir el número de ratones utilizados.

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical (n= 4 por edad). Por un lado se realizó la disección y se extrajeron los siguientes órganos: hígado, pulmón, riñón,

páncreas, bazo, timo, testículo y corazón. Por otro lado cada ratón fue decapitado y se extrajo el cerebro. Cada una de las muestras fueron rápidamente depositadas en nitrógeno líquido y conservadas a -80 °C hasta su uso para la extracción de RNA y proteínas totales.

Para la extracción del RNA total se pesaron aproximadamente 100 mg de cada tejido y los mismos fueron homogenizados con un potter de vidrio en 750 ul de solución desnaturizante D. Luego se procedió con la extracción del RNA tal como se describe en la sección 6.

Para la extracción de proteínas totales, se pesaron aproximadamente 80 mg de cada tejido. Cada muestra fue homogenizada con potter de vidrio con 1 ml de una solución que contiene SDS 2% pH 6,8. Una vez disgregada la muestra se la incubó 10 min. a 70 °C y luego se centrifugó por 20 min. a 14.000 rpm. Se separó el sobrenadante y se descarto el pellet. Una alícuota de cada muestra fue resuspendida en buffer de siembra 1X y, previo a la realización de la corrida electroforética, cada muestra fue sonicada por 15 segundos a 40% de amplitud. Luego se procedió como se describe en la sección 7.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografia

Adams, P. D. (2007). Remodeling of chromatin structure in senescent cells and its potential impact on tumor suppression and aging. *Gene* 397, 84-93.

Agarwal, A., Makker, K., and Sharma, R. (2008). Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol* 59, 2-11.

Al-Mohanna, M. A., Manogaran, P. S., Al-Mukhalafi, Z., K, A. A.-H., and Aboussekhra, A. (2004). The tumor suppressor p16(INK4a) gene is a regulator of apoptosis induced by ultraviolet light and cisplatin. *Oncogene* 23, 201-212.

Alcorta, D. A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D., and Barrett, J. C. (1996). Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13742-13747.

Arienti, K. L., Brunmark, A., Axe, F. U., McClure, K., Lee, A., Blevitt, J., Neff, D. K., Huang, L., Crawford, S., Pandit, C. R., *et al.* (2005). Checkpoint kinase inhibitors: SAR and radioprotective properties of a series of 2-arylbenzimidazoles. *J Med Chem* 48, 1873-1885.

Baird, D. T., Collins, J., Egozcue, J., Evers, L. H., Gianaroli, L., Leridon, H., Sunde, A., Templeton, A., Van Steirteghem, A., Cohen, J., *et al.* (2005). Fertility and ageing. *Hum Reprod Update* 11, 261-276.

Bartek, J., and Lukas, J. (2001). Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* 13, 738-747.

Bartkova, J., Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L. V., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V. C., *et al.* (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 444, 633-637.

Ben-Porath, I., and Weinberg, R. A. (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 961-976.

Bishop, J. M. (1995). Cancer: the rise of the genetic paradigm. *Genes Dev* 9, 1309-1315.

Blander, G., de Oliveira, R. M., Conboy, C. M., Haigis, M., and Guarente, L. (2003). Superoxide dismutase 1 knock-down induces senescence in human fibroblasts. *J Biol Chem* 278, 38966-38969.

Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C. P., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S., and Wright, W. E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349-352.

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

- Braig, M., and Schmitt, C. A. (2006). Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development. *Cancer Res* 66, 2881-2884.
- Bringold, F., and Serrano, M. (2000). Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol* 35, 317-329.
- Brown, J. P., Wei, W., and Sedivy, J. M. (1997). Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* 277, 831-834.
- Bulavin, D. V., Amundson, S. A., and Fornace, A. J. (2002). p38 and Chk1 kinases: different conductors for the G(2)/M checkpoint symphony. *Curr Opin Genet Dev* 12, 92-97.
- Busuttill, R. A., Rubio, M., Dolle, M. E., Campisi, J., and Vijg, J. (2006). Mutant frequencies and spectra depend on growth state and passage number in cells cultured from transgenic lacZ-plasmid reporter mice. *DNA Repair (Amst)* 5, 52-60.
- Campisi, J. (2001). Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol* 11, S27-31.
- Campisi, J. (2003). Cancer and ageing: rival demons? *Nat Rev Cancer* 3, 339-349.
- Campisi, J. (2005). Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120, 513-522.
- Campisi, J., and d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 729-740.
- Canepa, E. T., Scassa, M. E., Ceruti, J. M., Marazita, M. C., Carcagno, A. L., Sirkin, P. F., and Ogara, M. F. (2007). INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life* 59, 419-426.
- Carbone, C. J., Grana, X., Reddy, E. P., and Haines, D. S. (2007). p21 loss cooperates with INK4 inactivation facilitating immortalization and Bcl-2-mediated anchorage-independent growth of oncogene-transduced primary mouse fibroblasts. *Cancer Res* 67, 4130-4137.
- Carcagno, A. L., Marazita, M. C., Ogara, M. F., Ceruti, J. M., Sonzogni, S. V., Scassa, M. E., Giono, L. E., and Canepa, E. T. (2011). E2F1-mediated upregulation of p19INK4d determines its periodic expression during cell cycle and regulates cellular proliferation. *PLoS One* 6, e21938.
- Cerda, M. C., Berrios, S., Fernandez-Donoso, R., Garagna, S., and Redi, C. (1999). Organisation of complex nuclear domains in somatic mouse cells. *Biol Cell* 91, 55-65.
- Ceruti, J. M., Scassa, M. E., Flo, J. M., Varone, C. L., and Canepa, E. T. (2005). Induction of p19INK4d in response to ultraviolet light improves DNA repair and confers resistance to apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene* 24, 4065-4080.

Ceruti, J. M., Scassa, M. E., Marazita, M. C., Carcagno, A. C., Sirkin, P. F., and Canepa, E. T. (2009). Transcriptional upregulation of p19INK4d upon diverse genotoxic stress is critical for optimal DNA damage response. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 1344-1353.

Cocuzza, M., Athayde, K. S., Agarwal, A., Sharma, R., Pagani, R., Lucon, A. M., Srougi, M., and Hallak, J. (2008). Age-related increase of reactive oxygen species in neat semen in healthy fertile men. *Urology* 71, 490-494.

Cohen, S. N., Chang, A. C., and Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69, 2110-2114.

Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Barradas, M., Benguria, A., Zaballos, A., Flores, J. M., Barbacid, M., *et al.* (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436, 642.

Collado, M., and Serrano, M. (2006). The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer* 6, 472-476.

Coppe, J. P., Kauser, K., Campisi, J., and Beausejour, C. M. (2006). Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem* 281, 29568-29574.

Coppe, J. P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Munoz, D. P., Goldstein, J., Nelson, P. S., Desprez, P. Y., and Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* 6, 2853-2868.

Cosme-Blanco, W., Shen, M. F., Lazar, A. J., Pathak, S., Lozano, G., Multani, A. S., and Chang, S. (2007). Telomere dysfunction suppresses spontaneous tumorigenesis in vivo by initiating p53-dependent cellular senescence. *EMBO Rep* 8, 497-503.

Costanzo, V., Shechter, D., Lupardus, P. J., Cimprich, K. A., Gottesman, M., and

Gautier, J. (2003). An ATR- and Cdc7-dependent DNA damage checkpoint that inhibits initiation of DNA replication. *Mol Cell* 11, 203-213.

Cunningham, J. J., and Roussel, M. F. (2001). Cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of the central nervous system. *Cell Growth Differ* 12, 387-396.

Chan, F. K., Zhang, J., Cheng, L., Shapiro, D. N., and Winoto, A. (1995). Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4. *Mol Cell Biol* 15, 2682-2688.

Chan, H. M., Narita, M., Lowe, S. W., and Livingston, D. M. (2005). The p400 E1A-associated protein is a novel component of the p53 --> p21 senescence pathway. *Genes Dev* 19, 196-201.

Chang, B. D., Swift, M. E., Shen, M., Fang, J., Broude, E. V., and Roninson, I. B. (2002). Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 389-394.

Chen, Z., Trotman, L. C., Shaffer, D., Lin, H. K., Dotan, Z. A., Niki, M., Koutcher, J. A., Scher, H. I., Ludwig, T., Gerald, W., *et al.* (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* *436*, 725-730.

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* *162*, 156-159.

d'Adda di Fagagna, F. (2008). Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer* *8*, 512-522.

d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N. P., and Jackson, S. P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* *426*, 194-198.

Decottignies, A., and d'Adda di Fagagna, F. (2011). Epigenetic alterations associated with cellular senescence: a barrier against tumorigenesis or a red carpet for cancer? *Semin Cancer Biol* *21*, 360-366.

Desai, N., Sabanegh, E., Jr., Kim, T., and Agarwal, A. (2010). Free radical theory of aging: implications in male infertility. *Urology* *75*, 14-19.

Di Leonardo, A., Linke, S. P., Clarkin, K., and Wahl, G. M. (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* *8*, 2540-2551.

Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre, M., Nuciforo, P. G., Bensimon, A., *et al.* (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* *444*, 638-642.

Di Micco, R., Fumagalli, M., and d'Adda di Fagagna, F. (2007). Breaking news: high-speed race ends in arrest--how oncogenes induce senescence. *Trends Cell Biol* *17*, 529-536.

Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., and *et al.* (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 9363-9367.

Drummond-Barbosa, D. (2008). Stem cells, their niches and the systemic environment: an aging network. *Genetics* *180*, 1787-1797.

Franceschi, F., Longo, U. G., Ruzzini, L., Rizzello, G., Maffulli, N., and Denaro, V. (2008). No advantages in repairing a type II superior labrum anterior and posterior (SLAP) lesion when associated with rotator cuff repair in patients over age 50: a randomized controlled trial. *Am J Sports Med* *36*, 247-253.

Funayama, R., and Ishikawa, F. (2007). Cellular senescence and chromatin structure. *Chromosoma* *116*, 431-440.

- Funayama, R., Saito, M., Tanobe, H., and Ishikawa, F. (2006). Loss of linker histone H1 in cellular senescence. *J Cell Biol* 175, 869-880.
- Furuta, T., Takemura, H., Liao, Z. Y., Aune, G. J., Redon, C., Sedelnikova, O. A., Pilch, D. R., Rogakou, E. P., Celeste, A., Chen, H. T., *et al.* (2003). Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J Biol Chem* 278, 20303-20312.
- Gatei, M., Sloper, K., Sorensen, C., Syljuasen, R., Falck, J., Hobson, K., Savage, K., Lukas, J., Zhou, B. B., Bartek, J., and Khanna, K. K. (2003). Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation. *J Biol Chem* 278, 14806-14811.
- Grana, X., Garriga, J., and Mayol, X. (1998). Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth. *Oncogene* 17, 3365-3383.
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., and Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883-899.
- Guan, K. L., Jenkins, C. W., Li, Y., O'Keefe, C. L., Noh, S., Wu, X., Zariwala, M., Matera, A. G., and Xiong, Y. (1996). Isolation and characterization of p19INK4d, a p16-related inhibitor specific to CDK6 and CDK4. *Mol Biol Cell* 7, 57-70.
- Han, Z., Wei, W., Dunaway, S., Darnowski, J. W., Calabresi, P., Sedivy, J., Hendrickson, E. A., Balan, K. V., Pantazis, P., and Wyche, J. H. (2002). Role of p21 in apoptosis and senescence of human colon cancer cells treated with camptothecin. *J Biol Chem* 277, 17154-17160.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hannon, G. J., and Beach, D. (1994). p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 371, 257-261.
- Harley, C. B., Futcher, A. B., and Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460.
- Harper, J. W., and Elledge, S. J. (2007). The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* 28, 739-745.
- Hartwell, L. H., and Weinert, T. A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246, 629-634.
- Hayflick, L. (1965). The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 37, 614-636.
- Hemann, M. T., and Narita, M. (2007). Oncogenes and senescence: breaking down in the fast lane. *Genes Dev* 21, 1-5.

Hengst, L., and Reed, S. I. (1998). Inhibitors of the Cip/Kip family. *Curr Top Microbiol Immunol* 227, 25-41.

Hickson, I., Zhao, Y., Richardson, C. J., Green, S. J., Martin, N. M., Orr, A. I., Reaper, P. M., Jackson, S. P., Curtin, N. J., and Smith, G. C. (2004). Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer Res* 64, 9152-9159.

Hirai, H., Roussel, M. F., Kato, J. Y., Ashmun, R. A., and Sherr, C. J. (1995). Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol* 15, 2672-2681.

Hirama, T., and Koeffler, H. P. (1995). Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood* 86, 841-854.

Hitomi, T., Matsuzaki, Y., Yokota, T., Takaoka, Y., and Sakai, T. (2003). p15(INK4b) in HDAC inhibitor-induced growth arrest. *FEBS Lett* 554, 347-350.

Ishikawa, F. (2003). Cellular senescence, an unpopular yet trustworthy tumor suppressor mechanism. *Cancer Sci* 94, 944-947.

Iwasa, H., Han, J., and Ishikawa, F. (2003). Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes Cells* 8, 131-144.

Jackson, J. G., and Pereira-Smith, O. M. (2006). p53 is preferentially recruited to the promoters of growth arrest genes p21 and GADD45 during replicative senescence of normal human fibroblasts. *Cancer Res* 66, 8356-8360.

Jackson, J. R., Gilmartin, A., Imburgia, C., Winkler, J. D., Marshall, L. A., and Roshak, A. (2000). An indolocarbazole inhibitor of human checkpoint kinase (Chk1) abrogates cell cycle arrest caused by DNA damage. *Cancer Res* 60, 566-572.

Jeyapalan, J. C., Ferreira, M., Sedivy, J. M., and Herbig, U. (2007). Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates. *Mech Ageing Dev* 128, 36-44.

Kanazawa, S., Fujiwara, Y., and Mizuno, K. (1994). Selective repression of growth-regulating cdk2, cyclin E and E2F1 genes in human cell senescence. *Kobe J Med Sci* 40, 165-174.

Kiyokawa, H., Kineman, R. D., Manova-Todorova, K. O., Soares, V. C., Hoffman, E. S., Ono, M., Khanam, D., Hayday, A. C., Frohman, L. A., and Koff, A. (1996). Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell* 85, 721-732.

Krishna, D. R., Sperker, B., Fritz, P., and Klotz, U. (1999). Does pH 6 beta-galactosidase activity indicate cell senescence? *Mech Ageing Dev* 109, 113-123.

Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P. Y., and Campisi, J. (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12072-12077.

Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y., and Erusalimsky, J. D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* *113* (Pt 20), 3613-3622.

Kyriakis, J. M., and Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* *81*, 807-869.

Lee, A. C., Fenster, B. E., Ito, H., Takeda, K., Bae, N. S., Hirai, T., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Howard, B. H., and Finkel, T. (1999). Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem* *274*, 7936-7940.

Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., Kleijer, W. J., DiMaio, D., and Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* *5*, 187-195.

Liu, D., and Hornsby, P. J. (2007). Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res* *67*, 3117-3126.

Lou, Z., and Chen, J. (2006). Cellular senescence and DNA repair. *Exp Cell Res* *312*, 2641-2646.

Lowe, S. W., and Sherr, C. J. (2003). Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev* *13*, 77-83.

Lukas, C., Bartkova, J., Latella, L., Falck, J., Mailand, N., Schroeder, T., Sehested, M., Lukas, J., and Bartek, J. (2001). DNA damage-activated kinase Chk2 is independent of proliferation or differentiation yet correlates with tissue biology. *Cancer Res* *61*, 4990-4993.

Lukas, C., Falck, J., Bartkova, J., Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nat Cell Biol* *5*, 255-260.

Matheu, A., Maraver, A., Collado, M., Garcia-Cao, I., Canamero, M., Borrás, C., Flores, J. M., Klatt, P., Vina, J., and Serrano, M. (2009). Anti-aging activity of the Ink4/Arf locus. *Aging Cell* *8*, 152-161.

Matsuzaki, Y., and Sakai, T. (2005). INK4 Family -A promising target for 'gene-regulating chemoprevention' and 'molecular-targeting prevention' of cancer. *Environ Health Prev Med* *10*, 72-77.

Matuoka, K., and Chen, K. Y. (2000). Possible role of subunit A of nuclear factor Y (NF-YA) in normal human diploid fibroblasts during senescence. *Biogerontology* *1*, 261-271.

McGowan, C. H. (2002). Checking in on Cds1 (Chk2): A checkpoint kinase and tumor suppressor. *Bioessays* *24*, 502-511.

- McMaster, G. K., and Carmichael, G. G. (1977). Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc Natl Acad Sci U S A* *74*, 4835-4838.
- Melk, A., Kittikowit, W., Sandhu, I., Halloran, K. M., Grimm, P., Schmidt, B. M., and Halloran, P. F. (2003). Cell senescence in rat kidneys in vivo increases with growth and age despite lack of telomere shortening. *Kidney Int* *63*, 2134-2143.
- Michaloglou, C., Vredeveld, L. C., Soengas, M. S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C. M., Majoor, D. M., Shay, J. W., Mooi, W. J., and Peeper, D. S. (2005). BRAF^{V600E}-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* *436*, 720-724.
- Molofsky, A. V., Slutsky, S. G., Joseph, N. M., He, S., Pardal, R., Krishnamurthy, J., Sharpless, N. E., and Morrison, S. J. (2006). Increasing p16^{INK4a} expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature* *443*, 448-452.
- Morishita, A., Gong, J., Deguchi, A., Tani, J., Miyoshi, H., Yoshida, H., Himoto, T., Yoneyama, H., Mori, H., Kato, K., *et al.* (2011). Frequent loss of p19^{INK4D} expression in hepatocellular carcinoma: relationship to tumor differentiation and patient survival. *Oncol Rep* *26*, 1363-1368.
- Mullany, S., Svingen, P. A., Kaufmann, S. H., and Erlichman, C. (1998). Effect of adding the topoisomerase I poison 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) to 5-fluorouracil and folinic acid in HCT-8 cells: elevated dTTP pools and enhanced cytotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol* *42*, 391-399.
- Nakayama, K., and Nakayama, K. (1998). Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors: brakes of the cell cycle engine during development. *Bioessays* *20*, 1020-1029.
- Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J., and Lowe, S. W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* *113*, 703-716.
- Nelson, W. G., and Kastan, M. B. (1994). DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol Cell Biol* *14*, 1815-1823.
- Niida, H., and Nakanishi, M. (2006). DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis* *21*, 3-9.
- Noda, A., Ning, Y., Venable, S. F., Pereira-Smith, O. M., and Smith, J. R. (1994). Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* *211*, 90-98.
- Ogryzko, V. V., Hirai, T. H., Russanova, V. R., Barbie, D. A., and Howard, B. H. (1996). Human fibroblast commitment to a senescence-like state in response to histone deacetylase inhibitors is cell cycle dependent. *Mol Cell Biol* *16*, 5210-5218.

- Ortega, S., Malumbres, M., and Barbacid, M. (2002). Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta* *1602*, 73-87.
- Palmero, I., McConnell, B., Parry, D., Brookes, S., Hara, E., Bates, S., Jat, P., and Peters, G. (1997). Accumulation of p16INK4a in mouse fibroblasts as a function of replicative senescence and not of retinoblastoma gene status. *Oncogene* *15*, 495-503.
- Pantoja, C., and Serrano, M. (1999). Murine fibroblasts lacking p21 undergo senescence and are resistant to transformation by oncogenic Ras. *Oncogene* *18*, 4974-4982.
- Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., and Campisi, J. (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* *5*, 741-747.
- Pendergrass, W. R., Lane, M. A., Bodkin, N. L., Hansen, B. C., Ingram, D. K., Roth, G. S., Yi, L., Bin, H., and Wolf, N. S. (1999). Cellular proliferation potential during aging and caloric restriction in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *J Cell Physiol* *180*, 123-130.
- Quereda, V., Martinalbo, J., Dubus, P., Carnero, A., and Malumbres, M. (2007). Genetic cooperation between p21Cip1 and INK4 inhibitors in cellular senescence and tumor suppression. *Oncogene* *26*, 7665-7674.
- Rayess, H., Wang, M. B., and Srivatsan, E. S. (2011). Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int J Cancer*.
- Rebbaa, A., Zheng, X., Chou, P. M., and Mirkin, B. L. (2003). Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. *Oncogene* *22*, 2805-2811.
- Roberson, R. S., Kussick, S. J., Vallieres, E., Chen, S. Y., and Wu, D. Y. (2005). Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. *Cancer Res* *65*, 2795-2803.
- Rodier, F., and Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* *192*, 547-556.
- Rodier, F., Coppe, J. P., Patil, C. K., Hoeijmakers, W. A., Munoz, D. P., Raza, S. R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A. R., and Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* *11*, 973-979.
- Rodier, F., Munoz, D. P., Teachenor, R., Chu, V., Le, O., Bhaumik, D., Coppe, J. P., Campeau, E., Beausejour, C. M., Kim, S. H., *et al.* (2011). DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J Cell Sci* *124*, 68-81.
- Roninson, I. B. (2003). Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res* *63*, 2705-2715.

- Roussel, M. F. (1999). The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* 18, 5311-5317.
- Sager, R. (1991). Senescence as a mode of tumor suppression. *Environ Health Perspect* 93, 59-62.
- Sarkaria, J. N., Busby, E. C., Tibbetts, R. S., Roos, P., Taya, Y., Karnitz, L. M., and Abraham, R. T. (1999). Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Res* 59, 4375-4382.
- Scassa, M. E., Marazita, M. C., Ceruti, J. M., Carcagno, A. L., Sirkin, P. F., Gonzalez-Cid, M., Pignataro, O. P., and Canepa, E. T. (2007). Cell cycle inhibitor, p19INK4d, promotes cell survival and decreases chromosomal aberrations after genotoxic insult due to enhanced DNA repair. *DNA Repair (Amst)* 6, 626-638.
- Schmitt, C. A. (2003). Senescence, apoptosis and therapy--cutting the lifelines of cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 286-295.
- Serrano, M., Hannon, G. J., and Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366, 704-707.
- Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., and Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602.
- Shay, J. W., and Roninson, I. B. (2004). Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene* 23, 2919-2933.
- Sherr, C. J. (2004). Principles of tumor suppression. *Cell* 116, 235-246.
- Sherr, C. J., and McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2, 103-112.
- Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13, 1501-1512.
- Sigal, S. H., Rajvanshi, P., Gorla, G. R., Sokhi, R. P., Saxena, R., Gebhard, D. R., Jr., Reid, L. M., and Gupta, S. (1999). Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events. *Am J Physiol* 276, G1260-1272.
- Sorensen, C. S., Syljuasen, R. G., Falck, J., Schroeder, T., Ronnstrand, L., Khanna, K. K., Zhou, B. B., Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell* 3, 247-258.
- Stein, G. H., Drullinger, L. F., Robetorye, R. S., Pereira-Smith, O. M., and Smith, J. R. (1991). Senescent cells fail to express cdc2, cycA, and cycB in response to mitogen stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 11012-11016.

Stein, G. H., Drullinger, L. F., Soulard, A., and Dulic, V. (1999). Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol* 19, 2109-2117.

Takai, H., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2003). DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol* 13, 1549-1556.

Tavera-Mendoza, L. E., Wang, T. T., and White, J. H. (2006). p19INK4D and cell death. *Cell Cycle* 5, 596-598.

te Poele, R. H., Okorokov, A. L., Jardine, L., Cummings, J., and Joel, S. P. (2002). DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 62, 1876-1883.

Trimarchi, J. M., and Lees, J. A. (2002). Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 11-20.

Tyner, S. D., Venkatachalam, S., Choi, J., Jones, S., Ghebranious, N., Igelmann, H., Lu, X., Soron, G., Cooper, B., Brayton, C., *et al.* (2002). p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* 415, 45-53.

van Heemst, D., den Reijer, P. M., and Westendorp, R. G. (2007). Ageing or cancer: a review on the role of caretakers and gatekeepers. *Eur J Cancer* 43, 2144-2152.

Wada, T., Joza, N., Cheng, H. Y., Sasaki, T., Kozieradzki, I., Bachmaier, K., Katada, T., Schreiber, M., Wagner, E. F., Nishina, H., and Penninger, J. M. (2004). MKK7 couples stress signalling to G2/M cell-cycle progression and cellular senescence. *Nat Cell Biol* 6, 215-226.

Wahl, G. M., and Carr, A. M. (2001). The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nat Cell Biol* 3, E277-286.

Wang, W., Chen, J. X., Liao, R., Deng, Q., Zhou, J. J., Huang, S., and Sun, P. (2002). Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Mol Cell Biol* 22, 3389-3403.

Wu, J., Xue, L., Weng, M., Sun, Y., Zhang, Z., Wang, W., and Tong, T. (2007). Sp1 is essential for p16 expression in human diploid fibroblasts during senescence. *PLoS One* 2, e164.

Yaswen, P., and Campisi, J. (2007). Oncogene-induced senescence pathways weave an intricate tapestry. *Cell* 128, 233-234.

Yokota, T., Matsuzaki, Y., Miyazawa, K., Zindy, F., Roussel, M. F., and Sakai, T. (2004). Histone deacetylase inhibitors activate INK4d gene through Sp1 site in its promoter. *Oncogene* 23, 5340-5349.

Zhang, H., Pan, K. H., and Cohen, S. N. (2003). Senescence-specific gene expression fingerprints reveal cell-type-dependent physical clustering of up-regulated chromosomal loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 3251-3256.

Zhang, R., Chen, W., and Adams, P. D. (2007). Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci. *Mol Cell Biol* *27*, 2343-2358.

Zhang, S., McCarter, J. D., Okamura-Oho, Y., Yaghi, F., Hinek, A., Withers, S. G., and Callahan, J. W. (1994). Kinetic mechanism and characterization of human beta-galactosidase precursor secreted by permanently transfected Chinese hamster ovary cells. *Biochem J* *304* (Pt 1), 281-288.

Zheng, X., Chou, P. M., Mirkin, B. L., and Rebbaa, A. (2004). Senescence-initiated reversal of drug resistance: specific role of cathepsin L. *Cancer Res* *64*, 1773-1780.

Zhou, B. B., and Elledge, S. J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* *408*, 433-439.

Zindy, F., Cunningham, J. J., Sherr, C. J., Jogle, S., Smeyne, R. J., and Roussel, M. F. (1999). Postnatal neuronal proliferation in mice lacking Ink4d and Kip1 inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 13462-13467.

Zindy, F., Quelle, D. E., Roussel, M. F., and Sherr, C. J. (1997). Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* *15*, 203-211.

Zindy, F., van Deursen, J., Grosveld, G., Sherr, C. J., and Roussel, M. F. (2000). INK4d-deficient mice are fertile despite testicular atrophy. *Mol Cell Biol* *20*, 372-378.