



UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y
MICROBIOLOGÍA

IMPLICACIÓN DE SIRT1, UNA DESACETILASA
DEPENDIENTE DE NAD⁺, EN LA REGULACIÓN DE
LA TRANSCRIPCIÓN POR TGF β

Dña. Eva María García Vizcaíno

2013

*Al bebé que está creciendo dentro de mí
y que pronto alegrará nuestras vidas.*

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que durante estos años de trabajo han estado a mi lado, familia, amigos y compañeros, y que de una u otra forma han contribuido a que esta tesis haya llegado a su fin. A todos ellos, muchas gracias.

Al Dr. Francisco José Nicolás Villaescusa, mi director de tesis doctoral, por haber creído en mí y en esta tesis, y luchar por ella hasta el final. Por enseñarme en qué consiste la investigación y por animarme siempre a continuar incluso en los momentos donde lo veía todo negro para terminar.

A mis compañeras y amigas, Concepción López Martínez, la Dra. Antonia Alcaráz, la Dra. Isabel Legaz, la Dra. Anna Mrowiec y la Dra. Laura Martínez. Por su ayuda inconmensurable en el laboratorio, donde siempre hubo sonrisas y una palabra de aliento en los momentos malos. Os debo que este trabajo haya salido adelante. ¡Gracias por ser como sois! También a la Dra. Catalina Ruiz, que aunque sólo ha estado en nuestro laboratorio un año, su ayuda ha sido de gran valor para poder terminar esta tesis.

Al Dr. Carlos de Torre, por estar siempre ahí y aconsejarme cuando más lo necesitaba.

Al Dr. Agustín Sola, por su ayuda en los últimos trámites de esta tesis doctoral. Suerte en la continuación de “la saga”.

Al Dr. Henk Stunnenberg, la Dra. Filomena Matarese, la Dra. Floriana de Bellis y el Dr. Enrique Carrillo. Por adentrarme en el, para mí nuevo y difícil mundo, de las técnicas de metaanálisis de expresión génica y mapeo de factores de transcripción. Gracias por vuestra ayuda en la realización y análisis de estas técnicas.

A la Dra. Marta Agudo. Por su valiosa ayuda en los análisis de agrupamiento funcional realizados en esta tesis doctoral. Gracias por aportarnos los conocimientos necesarios para afrontar el análisis de estos datos.

A la Dra. Caroline Hill. Por proveernos de diversos plásmidos necesarios para la realización de esta tesis doctoral y, sobre todo, por acogerme en su laboratorio para el aprendizaje de diversas técnicas de laboratorio.

A la Fundación Séneca, por financiarme con una beca predoctoral que me ha permitido realizar esta tesis doctoral.

A mis padres y mi hermana. Por su apoyo incondicional durante todo este proceso, por sus consejos, por la motivación constante, pero sobre todo, gracias por haberme enseñado a luchar por lo que quiero y no rendirme en el intento.

A Gloria, Félix, Alfredo y Franci, que también son mi familia. Por el apoyo recibido durante todo este tiempo. Gracias de todo corazón.

A mis amigos. En este apartado me siento orgullosa de decir que son muchos los que engloban la palabra amigos. A “mis galletas”, toda una vida juntas y no me la imagino sin vosotras. A “los de biología”, que después de tantos años de sufrimiento en la facultad, nuestra amistad perdura a pesar de seguir caminos diferentes. A “los de Archena” por incluirme en vuestras vidas como una más. Y en general, a todos los amigos que me han “sufrido” durante la realización de esta tesis doctoral. A todos ellos, gracias por apoyarme siempre, sea cual fuera mi problema y, sobre todo, gracias por hacer de mi vida una vida más feliz.

Y por último, y no por ello el menos importante, a Dani. Gracias por todo el cariño y amor que me has dado durante toda nuestra vida juntos y que me sigues dando. Sé que sin ti, el camino para realizar esta tesis hubiera sido muchísimo más duro. Has sido mi mayor apoyo. Gracias por estar siempre a mi lado.

SIGLAS Y ABREVIATURAS

AcK	Acetil lisina
ALK 1-7	Activin receptor Like Kinase
AMP	Ampicilina
ARE	Activin Response Element
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CAM	Cloranfenicol
ChIP-Seq	Chromatin Immunoprecipitation-Sequencing
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNAP	DNA-Pulldown
DNasa-Seq	DNase I hypersensitive sites Sequencing
EMT	Transición Epitelio Mesénquima
G418	Gentamicina
GDF	Growth and Differentiation Factor
HAT	Acetiltransferasa de Histonas
HDAC	Desacetilasa de Histonas
IP	Inmunoprecipitación
Kan	Kanamicina
Kb	Kilobases
KD	Kilodalton
L	Linker
LB	Luria Broth
MH1	Mad-Homology 1
MH2	Mad-Homology 2
mRNA	RNA mensajero
NES	Señal de Exportación Nuclear
NLS	Señal de Localización Nuclear
NPC	Complejo del Poro Nuclear
NPS	Señal de Nucleoporo
p/v	Peso/Volumen
Pb	Pares de bases
pMyr-Librería(PH)	Librería de expresión humana de epitelio pulmonar adulto

qPCR	PCR cuantitativa
Rluc	Renilla Luciferasa
RNA-Seq	RNA-Sequencing
RPKM	Lecturas por kilobase por millón de lecturas mapeadas
rRNA	RNA ribosómico
SDS	Dodecil Sulfato Sódico
TGFβ	Transforming Growth Factor β
TSA	Trichostatin A
TβRI	Receptor de TGF β tipo I
TβRII	Receptor de TGF β tipo II
Ufc	Unidades Formadoras de Colonias
v/v	Volumen/Volumen
valor NE	Valor de Expresión Normalizada
WB	Western Blot
WT	Silvestre

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Superfamilia de TGFβ	3
I.2. Señalización de TGFβ	5
I.2.1. Ruta canónica de la señalización de TGF β	5
I.2.2. Transporte nucleocitoplasmático de las Smads	9
I.2.3. Ruta no canónica de la señalización de TGF β	10
I.3. Regulación de la señalización de TGFβ	12
I.3.1. Inhibición de la señalización	12
I.3.2. Regulación de la señalización de TGF β mediante modificaciones post-traduccionales	14
I.4. Transcripción regulada por las Smads	20
I.4.1. Propiedades de unión al DNA de las Smads y sus cofactores	20
I.4.2. Regulación de la transcripción por las Smads sobre la cromatina. Coactivadores y correpresores de las Smads	21
I.5. TGFβ y cáncer	25
I.6. Desacetilasas de Histonas (HDAC). Familia de las Sirtuinas	29
I.7. Sirt1: función, sustratos y localización	33
I.8. Regulación de la actividad y expresión de Sirt1	36
I.9. Silenciamiento de la cromatina y represión de la transcripción mediada por Sirt1	38
I.9.1. Influencia de la acetilación en la estructura de la cromatina: marcas de eucromatina y heterocromatina	39
I.9.2. Implicación de Sirt1 en el silenciamiento de la cromatina y represión de la transcripción	40
I.9.3. Implicación de Sirt1 en la represión de la transcripción por mecanismos independientes a la remodelación de la cromatina	43
I.10. Implicación de Sirt1 en cáncer	44
I.10.1. Papel de Sirt1 como promotor tumoral	44
I.10.2. Papel de Sirt1 como supresor tumoral	45
I.11. Sistema Doble Híbrido Cyto Trap[®]	47
I.12. Objetivos de la tesis doctoral	49
II. MATERIALES Y MÉTODOS	51
II.1. Sistema Doble Híbrido Cyto Trap[®]	53
II.1.1. Plásmidos utilizados	53
II.1.2. Clonación de la proteína cebo en el plásmido pSos	55
II.1.3. Clonación de la librería de expresión en el plásmido pMyr	56
II.1.4. Levaduras	57
II.1.5. Metodología del Sistema Doble Híbrido Cyto Trap [®]	57

II.2. Plásmidos y clonaciones	67
II.2.1. Protocolo general de clonación	67
II.2.2. Plásmidos utilizados y clonaciones realizadas	70
II.3. Cultivo celular	79
II.3.1. Líneas celulares	79
II.3.2. Medios de cultivo	80
II.4. Reactivos y enzimas	80
II.5. Métodos generales relativos al estudio de ácidos nucleicos	81
II.5.1. Extracción de ácidos nucleicos	81
II.5.2. Retrotranscripción	83
II.5.3. PCR cuantitativa o qPCR	83
II.6. Métodos generales relativos al estudio de proteínas	85
II.6.1. Transfección de células eucarióticas	85
II.6.2. Obtención de extractos proteicos en células eucarióticas	87
II.6.3. Western Blot	89
II.6.4. Tinción de Coomassie	91
II.6.5. Inmunoprecipitación	92
II.6.6. Inmunotinción	93
II.6.7. Expresión y purificación de proteínas fusionadas al epitopo GST	95
II.6.8. Expresión y purificación de proteínas fusionadas al epitopo 6xHis	97
II.6.9. Ensayo His-Pulldown	99
II.7. Técnicas de metaanálisis de expresión génica y mapeo de factores de transcripción	100
II.7.1. RNA-Sequencing (RNA-Seq)	100
II.7.2. Chromatin Immunoprecipitation-Sequencing (ChIP-Seq)	108
II.8. Otras técnicas y métodos	114
II.8.1. Ensayo de DNA-Pulldown	114
II.8.2. Ensayo de luciferasa	116
II.8.3. Separación celular por fluorescencia	117
III. RESULTADOS	119
III.1 Búsqueda de nuevas moléculas que interactúan con Smad2. Sistema Doble Híbrido Cyto Trap®	121
III.1.1. Estudio de Smad2 como proteína cebo	121
III.1.2. Búsqueda de moléculas que interactúan con Smad2 Δ 93	123
III.1.3. Verificación de la interacción de los clones seleccionados	125
III.2. ¿Interaccionan Smad2 y Sirt1 en células eucarióticas?	135
III.2.1. Estudio de la interacción de Smad2-Sirt1 <i>in vivo</i>	136
III.2.2. Estudio de la interacción entre Sirt1 y Smad2 endógenas	138

III.3. ¿Tiene Sirt1 algún efecto sobre la acetilación de Smad2?	139
III.3.1. Estudio de la acetilación de Smad2 en respuesta a TGF β en células Hep3B	140
III.3.2. ¿Se acetila Smad2 transfectado en respuesta a TGF β ?	140
III.3.3. ¿Afecta la actividad desacetilasa de Sirt1 a la acetilación de Smad2?	142
III.4. Estudio molecular de la interacción de Sirt1 y Smad2	143
III.4.1. Efecto de la acetilación de Smad2 en la interacción Smad2/Sirt1	143
III.4.2. Efecto de la actividad desacetilasa de Sirt1 sobre la interacción Smad2/Sirt1	145
III.4.3. Efecto de la fosforilación de Smad2 sobre la interacción Smad2/Sirt1	147
III.4.4. Sirt1 tiene más afinidad por la forma no fosforilada pero acetilada de Smad2	149
III.5. Estudio del complejo Sirt1/Smad2/Smad4	150
III.5.1. ¿Forman un complejo ternario Smad2, Smad4 y Sirt1?	150
III.5.2. Influencia de la actividad de Sirt1 en la formación del complejo Smad2/Smad4	153
III.6. Estudio <i>in vivo</i> de la interacción Smad3 y Sirt1	154
III.7. Estudio <i>in vitro</i> de la interacción de Sirt1 con Smad2, Smad3, y diferentes fragmentos de Smad2	155
III.8. Estudio <i>in vitro</i> de la interacción de Smad2 con diferentes fragmentos de Sirt1	159
III.9. Estudio <i>in vitro</i> de la interacción Sirt1 y Smad2 fosforilada	161
III.10. Efecto de TGFβ sobre la localización subcelular de Sirt1	162
III.11. Efecto de Sirt1 sobre la unión al DNA y activación transcripcional de Smad2 inducidas por TGFβ	169
III.11.1. Estudio de la formación de complejos Smad/Sirt1/DNA mediante el ensayo de DNA-Pulldown	169
III.11.2. Estudio del efecto de la sobreexpresión de Sirt1 sobre genes reporteros sensibles a TGF β	175
III.11.3. Estudio del efecto de la represión de Sirt1 sobre genes reporteros sensibles a TGF β	177
III.12. Estudio del efecto de Sirt1 sobre la expresión de genes inducidos por TGFβ: RNA-Seq	180
III.12.1. Estudio del efecto de la inhibición de Sirt1 en la expresión de genes inducidos por TGF β : RNA-Seq	180
III.12.2. Inmunoprecipitación de cromatina – Secuenciación (ChIP-Seq)	188
III.12.3. Análisis de los resultados del RNA-Seq	195
III.12.3.1. Análisis de la unión de GFP-Smad2 a los promotores y/o <i>enhancers</i> de los genes seleccionados tras el filtrado del	195

RNA-Seq	
III.12.3.2. Estudio de la duración del efecto antagónico sobre la transcripción de genes dependiente de TGF β provocado por la inhibición de Sirt1	197
III.12.3.3 Representación gráfica del efecto de la inhibición de Sirt1 sobre la transcripción de genes dependiente de TGF β . Efecto de la inhibición de Sirt1 a todos los tiempos	198
III.12.3.4. ¿Es el efecto de la inhibición de Sirt1 un efecto general sobre la transcripción?	205
III.12.4. Validación por qPCR de los genes seleccionados en el análisis del RNA-Seq	210
IV. DISCUSIÓN	213
IV.1. Búsqueda de nuevas moléculas que interaccionan con Smad2	215
IV.2. Elección de la proteína Sirt1. Estudio de su relación con la señalización de TGFβ	218
IV.3. Smad2 y Sirt1 interaccionan <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>. Su interacción se ve potenciada por TGFβ	219
IV.4. Sirt1 no afecta al estado acetilado de Smad2	221
IV.5. La interacción de Sirt1 con Smad2 es potenciada por la acetilación de Smad2 y la actividad desacetilasa de Sirt1	222
IV.6. En extractos proteicos totales, Sirt1 no se une a la forma fosforilada de Smad2 ni forma un complejo trimérico con Smad4/Smad2 fosforilada	224
IV.7. Sirt1 interacciona con Smad2 fosforilada <i>in vitro</i>	227
IV.8. Dominios que intervienen en la interacción entre Smad2 y Sirt1	228
IV.9. Sirt1 se une a Smad3 <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	231
IV.10. En células estimuladas con TGFβ, Sirt1 colocaliza en el núcleo con Smad2	232
IV.11. Sirt1 se une a promotores de genes dependientes de TGFβ	233
IV.12. Sirt1 inhibe la activación transcripcional de genes dependientes de TGFβ en ensayos con genes reporteros	235
IV.13. En un subconjunto de genes, la inhibición de Sirt1 antagoniza la transcripción dependiente de TGFβ	236
IV.14. La señalización de TGFβ que implica a Sirt1 está relacionada con procesos biológicos concretos	243
V. CONCLUSIONS (CONCLUSIONES)	251
VI. SUMMARY (RESUMEN)	257
VII. BIBLIOGRAFÍA	267

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

I. INTRODUCCIÓN

Figura 1.	Las proteínas Smad	5
Figura 2.	Los diferentes ligandos de la superfamilia de TGF β utilizan diferentes rutas de señalización	6
Figura 3.	Ruta de señalización de TGF β	8
Figura 4.	La estimulación de los receptores de TGF β dispara rutas canónicas y no canónicas	11
Figura 5.	Diferentes proteínas regulan la vía de señalización de TGF β	13
Figura 6.	Diferentes proteínas modifican post-traduccionalmente las proteínas Smad	15
Figura 7.	Estructura molecular de los nucleosomas	22
Figura 8.	Las Smads regulan la transcripción mediante la remodelación de la cromatina	23
Figura 9.	Papel de TGF β en cáncer	26
Figura 10.	Actividad de las Sirtuinas	30
Figura 11.	Sirtuinas de mamíferos	31
Figura 12.	Regulación de la actividad/expresión de Sirt1	38
Figura 13.	Mecanismos de regulación de la transcripción dependientes de Sirt1 en mamíferos	41
Figura 14.	Fundamento de la proliferación de las levaduras en el Sistema Doble Híbrido Cyto Trap [®]	49

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 15.	Plásmido pSos	53
Figura 16.	Plásmido pMyr	54
Figura 17.	Protocolo de búsqueda de moléculas que interaccionan con la proteína cebo mediante el Sistema Doble Híbrido Cyto Trap [®]	59
Figura 18.	Protocolo de verificación de la interacción de los Presuntos Clones Positivos	64
Figura 19.	Diseño del siRNA	77
Figura 20.	SB-431542 impide la señalización autocrina de TGF β en células HEK293T	86
Figura 21.	Metodología de la técnica de RNA-Seq	100
Figura 22.	Pasos de la secuenciación en el multise secuenciador Illumina Genome Analyzer II	107
Figura 23.	Metodología de la técnica de ChIP-Seq	109

III. RESULTADOS

Figura 24.	Proliferación de levaduras en la Prueba de Interacción	124
Figura 25.	Análisis de restricción de dos Presuntos Clones Positivos	126

Figura 26.	Prueba de Interacción realizada para la verificación de la interacción de los Presuntos Clones Positivos con pSos-Smad2 Δ 93	126
Figura 27.	Proliferación de levaduras en la Prueba de Interacción para la verificación de su interacción con pSos-Smad2 Δ 93	128
Figura 28.	Smad2 y Sirt1 interaccionan <i>in vivo</i> en células HEK293T y esta interacción se incrementa con la estimulación con TGF β	137
Figura 29.	Smad2 y Sirt1 interaccionan <i>in vivo</i> en células Hep3B y esta interacción se incrementa con la estimulación con TGF β	138
Figura 30.	En células Hep3B, la interacción entre Smad2 y Sirt1 endógenas incrementa en respuesta a la estimulación con TGF β	139
Figura 31.	Smad2 incrementa su acetilación en respuesta a TGF β en células Hep3B	140
Figura 32.	La estimulación con TGF β incrementa la acetilación de Smad2 y su unión a Sirt1 en células Hep3B	141
Figura 33.	Generación del mutante Sirt1H363Y por mutagénesis dirigida	142
Figura 34.	Sirt1 no está involucrada en la desacetilación de Smad2 en células Hep3B	143
Figura 35.	Generación de los mutantes Flag-Smad2K19,20,39R y Flag-Smad2K19,20,39Q por mutagénesis dirigida	144
Figura 36.	La interacción de Sirt1 con Smad2 se potencia con la mutación K->Q en los residuos de lisina 19, 20 y 39 de Smad2	145
Figura 37.	La actividad catalítica de Sirt1 es importante para su interacción con Smad2	146
Figura 38.	Generación de un mutante Flag-Smad2AAMA por mutagénesis dirigida que no se fosforila en respuesta a TGF β	147
Figura 39.	La fosforilación de Smad2 no es necesaria para la interacción de Sirt1 con Smad2	148
Figura 40.	Sirt1 tiene más afinidad por la forma no fosforilada pero acetilada de Smad2	149
Figura 41.	Smad2 interacciona con Smad4 y Sirt1 en respuesta a la estimulación con TGF β	151
Figura 42.	Smad4 interacciona con Smad2 en respuesta a la estimulación con TGF β , sin embargo, no interacciona con Sirt1	152
Figura 43.	Sirt1 interacciona con Smad2 no fosforilada, pero no con Smad4	152
Figura 44.	La activación de Sirt1 no compite la formación del complejo Smad2/Smad4 ni causa una terminación prematura de la fosforilación de Smad2 o de la interacción Smad2/Smad4	153
Figura 45.	Smad3 y Sirt1 interaccionan <i>in vivo</i> en células HEK293T	155
Figura 46.	Expresión y purificación de las distintas proteínas clonadas en el vector pGex-4T-1 y expresadas en la cepa de <i>E. coli</i> BL21	156
Figura 47.	Expresión y purificación de Sirt1WT-6xHis y Sirt1H363Y-6xHis clonadas en el vector pQE-70 y expresadas en la cepa de <i>E. coli</i> M15[pREP4]	158
Figura 48.	Sirt1 interacciona de manera directa con Smad2 y Smad3. La	158

	interacción entre Sirt1 y Smad2 se realiza a través del dominio MH1 y una zona incluida entre los dominios L y MH2	
Figura 49.	Sirt1 interacciona de manera directa con Smad2. La interacción entre Smad2 y Sirt1 se realiza a través una zona situada entre los aminoácidos 1 y 364 de Sirt1	160
Figura 50.	Sirt1 interacciona de manera directa con la forma fosforilada de Smad2	161
Figura 51.	En células HEK293T, la estimulación con TGF β induce la colocalización de Sirt1 y Smad2 en el núcleo	163
Figura 52.	En células HaCaT-GFP-Smad2, la estimulación con TGF β induce la colocalización de Sirt1 y Smad2 en el núcleo	165
Figura 53.	En células HaCaT, la estimulación con TGF β induce la colocalización de Sirt1 y Smad2 en el núcleo	167
Figura 54.	Sirt1 forma un complejo con Smad3 y Smad4 que se une a <i>c-jun</i> SBR en extractos de células HaCaT estimuladas con TGF β	170
Figura 55.	La incorporación de Sirt1 al complejo Smad3/Smad4 se produce antes o durante la formación del complejo Smad3/Smad4/ <i>c-jun</i> SBR	172
Figura 56.	Sirt1 se une al complejo Smad2/Smad3/Smad4/DE en extractos de células estimuladas con TGF β	174
Figura 57.	Sirt1 reprime parcialmente la estimulación transcripcional por TGF β del gen reportero DE-Luc. Dicha inhibición es dependiente de la actividad desacetilasa de Sirt1	176
Figura 58.	Sirt1 reprime parcialmente la activación transcripcional dependiente de TGF β del gen reportero ARE-Luc. Dicha inhibición es dependiente de la actividad desacetilasa de Sirt1	177
Figura 59.	La expresión de siRNA1 y siRNA2 en pTER-GFP es efectiva interfiriendo la expresión de Sirt1	178
Figura 60.	La disminución de los niveles de Sirt1 incrementa la activación transcripcional dependiente de TGF β del gen reportero DE-Luc	179
Figura 61.	Efecto de Sirt1 sobre la expresión de genes regulada por TGF β	181
Figura 62.	Fórmula de cálculo para el valor NE	183
Figura 63.	Representación en Diagramas de Venn de los grupos de genes seleccionados con Razón normalizada mayor a +0,7 o menor a -0,7 para cada uno de los tratamientos con los inhibidores EX527 y HR73 (Tabla 36)	186
Figura 64.	Variación de la expresión de dos genes con el tratamiento con TGF β en ausencia o presencia de los inhibidores de Sirt1, EX527 y HR73	187
Figura 65.	qPCR control de calidad del CHIP	189
Figura 66.	Histogramas de los perfiles de unión de GFP-Smad2 a los genes <i>SERPINE1</i> , <i>JUNB</i> , <i>ID1</i> , <i>MNT</i> y <i>HPRT1</i>	193
Figura 67.	Histogramas de los perfiles de unión de GFP-Smad2 a los genes <i>HOXC9</i> , <i>MKL2</i> , <i>CDK3</i> y <i>ANKRD9</i>	200

Figura 68.	Efecto de los inhibidores EX527 y HR73 sobre la expresión regulada por TGFβ de los genes con $\log_2(\text{NE}_{\text{InhibidorTx}}/\text{NE}_{\text{DMSOTx}}) > +0,7$ a 1 hora con TGFβ (grupo 1, tabla 40). Datos RNA-Seq	202
Figura 69.	Efecto de los inhibidores EX527 y HR73 sobre la expresión regulada por TGFβ de los genes con $\log_2(\text{NE}_{\text{InhibidorTx}}/\text{NE}_{\text{DMSOTx}}) > +0,7$ a 6 horas con TGFβ (grupo 2, tabla 40). Datos RNA-Seq.	203
Figura 70.	Efecto de los inhibidores EX527 y HR73 sobre la expresión regulada por TGFβ de los genes con $\log_2(\text{NE}_{\text{InhibidorTx}}/\text{NE}_{\text{DMSOTx}}) < -0,7$ a 1 hora con TGFβ (grupo 3, tabla 40). Datos RNA-Seq	204
Figura 71.	Efecto de los inhibidores EX527 y HR73 sobre la expresión regulada por TGFβ de los genes con $\log_2(\text{NE}_{\text{InhibidorTx}}/\text{NE}_{\text{DMSOTx}}) < -0,7$ a 6 horas con TGFβ (grupo 4, tabla 40). Datos RNA-Seq.	205
Figura 72.	Efecto de los inhibidores EX527 y HR73 sobre la expresión regulada por TGFβ de los genes <i>CDKN1A</i> , <i>PMEPAI</i> y <i>SMAD7</i> . Datos RNA-Seq	206
Figura 73.	Efecto de los inhibidores EX527 y HR73 sobre la expresión regulada por TGFβ de los genes <i>ID3</i> , <i>FOXQ1</i> y <i>RASSF5</i> . Datos RNA-Seq	207
Figura 74.	Histogramas de los perfiles de unión de GFP-Smad2 a los genes <i>CDKN1A</i> , <i>PMEPAI</i> y <i>SMAD7</i>	208
Figura 75.	Histogramas de los perfiles de unión de GFP-Smad2 a los genes <i>ID3</i> , <i>FOXQ1</i> y <i>RASSF5</i>	209
Figura 76.	Efecto de los inhibidores EX527 y HR73 sobre la expresión de genes que son regulados negativamente por TGFβ ($\log_2(\text{NE}_{\text{InhibidorTx}}/\text{NE}_{\text{DMSOTx}})$ es mayor a +0,7 a 1 hora con TGFβ: grupo 1, tabla 40). Datos qPCR	211
Figura 77.	Efecto de los inhibidores EX527 y HR73 sobre la expresión de genes que son regulados negativamente por TGFβ ($\log_2(\text{NE}_{\text{InhibidorTx}}/\text{NE}_{\text{DMSOTx}})$ es mayor a +0,7 a 6 horas con TGFβ: grupo 2, tabla 40). Datos qPCR	212

IV. DISCUSIÓN

Figura 78.	Similitud de secuencia en los dominios de unión a Sirt1 de Smad2 y Smad7	229
Figura 79.	Posibles vías de regulación de la transcripción mediada por TGFβ y Sirt1	242
Figura 80.	Los inhibidores de Sirt1, EX527 y HR73, afectan a la expresión de genes regulados por TGFβ involucrados en inducción de EMT dependiente de TGFβ vía MAPK	247
Figura 81.	Los inhibidores de Sirt1, EX527 y HR73, afectan a la expresión de genes regulados por TGFβ que están involucrados en vía clásica del complemento	248
Figura 82.	Los inhibidores de Sirt1, EX527 y HR73, afectan a la expresión de	249

genes regulados por TGF β que están involucrados en remodelación de matriz extracelular

- Figura 83.** Los inhibidores de Sirt1, EX527 y HR73, afectan a la expresión de genes regulados por TGF β que están involucrados en TGF, WNT y remodelación del citoesqueleto 250

TABLAS

I. INTRODUCCIÓN

- Tabla 1.** Diferentes características de las Sirtuinas de mamíferos 32

II. MATERIALES Y MÉTODOS

- Tabla 2.** Clonaciones de diferentes fragmentos de Smad2 en el vector pSos 55
- Tabla 3.** Clonación de Smad4 en el vector pMyr 56
- Tabla 4.** Componentes de “10X Dropout Solution” 62
- Tabla 5.** Lista de primer usados en las clonaciones/secuenciaciones de este trabajo 69
- Tabla 6.** Clonaciones realizadas en el vector pEF-Flag 71
- Tabla 7.** Clonaciones realizadas en el vector pEF-HA 72
- Tabla 8.** Clonaciones realizadas en el vector pEF-Myc 72
- Tabla 9.** Clonaciones realizadas en el vector pGEX-4T-1 73
- Tabla 10.** Clonaciones realizadas en el vector pQE-70 74
- Tabla 11.** Clonación realizada en el vector pEGFP-C1 75
- Tabla 12.** Clonaciones realizadas en el vector pTER 76
- Tabla 13.** siRNAs diseñados en este trabajo 77
- Tabla 14.** Clonaciones realizadas en el vector pTER-GFP 78
- Tabla 15.** Plásmidos clonados en el vector pGL3-luc utilizados en este trabajo 79
- Tabla 16.** Reactivos y enzimas utilizados en este trabajo 81
- Tabla 17.** Primers diseñados con el programa Primer3 utilizados en este trabajo 83
- Tabla 18.** Primers QuantiTect[®] utilizados en este trabajo 84
- Tabla 19.** Valores para la transfección óptima con Lipofectamine[™] de las diferentes líneas celulares 85
- Tabla 20.** Anticuerpos primarios utilizados en Western Blot 90
- Tabla 21.** Anticuerpos secundarios utilizados en Western Blot 90
- Tabla 22.** Anticuerpos utilizados en inmunoprecipitación 93
- Tabla 23.** Anticuerpos primarios utilizados en inmunotinción 94
- Tabla 24.** Anticuerpos secundarios utilizados en inmunotinción 94
- Tabla 25.** Adaptadores de secuenciación para Illumina Genome Analyzer II 104
- Tabla 26.** Primers para la amplificación de fragmentos de DNA modificados con los adaptadores 105

Tabla 27.	Oligonucleótidos utilizados en la técnica de DNA-Pulldown	115
------------------	---	-----

III. RESULTADOS

Tabla 28.	Diferentes clonaciones realizadas en los plásmidos pSos y pMyr	122
Tabla 29.	Diferentes posibilidades de proliferación en la Prueba de Interacción	122
Tabla 30.	Resultado de la proliferación de las diferentes co-transformaciones de las construcciones de Smad2 en pSos y Smad4-pMyr en la Prueba de Interacción	123
Tabla 31.	Prueba de Verificación de la Interacción	127
Tabla 32.	Lista de los Clones Positivos Confirmados obtenidos	129
Tabla 33.	Agrupamiento funcional de los Clones Positivos Confirmados obtenidos	134
Tabla 34.	Valores de los coeficientes de colocación de Smad2 y Sirt1 con el tratamiento con TGF β en células HEK293T	166
Tabla 35.	Número de genes seleccionados cuya Razón ($\log_2(\text{NE}_{\text{InhibidorTx}}/\text{NE}_{\text{DMSOTx}})$) normalizada es mayor a +0,7 ó menor a -0,7	185
Tabla 36.	Número de genes seleccionados cuya Razón ($\log_2(\text{NE}_{\text{InhibidorTx}}/\text{NE}_{\text{DMSOTx}})$) normalizada es mayor a +0,7 ó menor a -0,7 para cada uno de los tratamientos con los inhibidores EX527 y HR73	186
Tabla 37.	Número de genes comunes a los tratamientos con los inhibidores EX527 y HR73, cuya Razón ($\log_2(\text{NE}_{\text{InhibidorTx}}/\text{NE}_{\text{DMSOTx}})$) normalizada es mayor a +0,7 ó menor a -0,7	187
Tabla 38.	Porcentaje de genes seleccionados tras el filtrado de los resultados del RNA-Seq (Tabla 37) que presentan un aumento en la unión de GFP-Smad2 con la estimulación con TGF β en su zona de DNA caracterizada como promotor/ <i>enhancer</i>	196
Tabla 39.	Porcentaje de genes donde GFP-Smad2 se une a la zona caracterizada como promotor/ <i>enhancer</i> tras la estimulación de las células con TGF β (Tabla 38) y el efecto antagónico de los inhibidores de Sirt1 es persistente a lo largo del tratamiento con dicha citoquina	198
Tabla 40.	Selección de 5 genes de cada uno de los grupos de genes donde GFP-Smad2 se une a la zona caracterizada como promotor/ <i>enhancer</i> tras la estimulación de las células con TGF β (grupos 1-4, tabla 38)	199

IV. DISCUSIÓN

Tabla 41.	Análisis funcional de genes regulados por TGF β cuya transcripción es modificada por los inhibidores de Sirt1, HR73 y EX527	244
------------------	---	-----

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Superfamilia de TGF β .

La superfamilia de TGF β es un gran grupo de citoquinas de vertebrados a la que pertenecen alrededor de 40 moléculas. Está compuesta por la subfamilia Transforming growth factor β (TGF β)/Activina/Nodal y la subfamilia Bone morphogenetic protein (BMP) / Growth and differentiation factor (GDF) / Mullerian inhibiting substance (MIS) (1-3). Estas subfamilias están definidas por la similitud de secuencia de los polipéptidos y las señalizaciones específicas que activan (1).

En mamíferos existen tres isoformas de TGF β que están altamente conservadas: TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3 (4). TGF β 1, en adelante referida como TGF β , es una proteína homodimérica que regula numerosas respuestas celulares involucradas en la proliferación y diferenciación celular, el desarrollo embrionario, la cicatrización de heridas, la angiogénesis y la apoptosis (2, 4). La respuesta génica a TGF β es diferente dependiendo del tipo celular, estado fisiológico de la célula, la concentración del ligando y duración del estímulo, lo cual explica la diversidad de respuestas celulares que esta citoquina es capaz de generar (5). La alteración de la señalización de TGF β ha sido relacionada con numerosas enfermedades como cáncer, arterioesclerosis, fibrosis y síndromes autoinmunes (4, 6).

Los principales mediadores de la cascada de señalización de TGF β son las proteínas Smad. El término Smad, deriva de la fusión de los nombres de los primeros miembros caracterizados de la familia, la proteína mothers against decapentaplegic (MAD) de *Drosophila melanogaster* y la proteína small body size (SMA) de *Caenorabditis elegans* (7). Las Smads están clasificadas en tres subgrupos: Smads reguladas por receptor (R-Smad), Smad coactivadora (Co-Smad) y Smads inhibitorias (I-Smad) (7). Las R-Smads incluyen dos subgrupos, el formado por Smad2 y Smad3 que es activado TGF β /Activina y el formado por Smad1, Smad5 y Smad8 que es activado por BMP. Dentro del grupo de Co-Smad se encuentra un único miembro, Smad4 (7, 8). Por último, el grupo de las I-Smads está formado por Smad6 y Smad7 que antagonizan específicamente la señalización de BMP y TGF β /Activina, respectivamente (9).

Las Smads, con aproximadamente 500 aminoácidos de longitud, tienen una estructura común que está definida por tres dominios característicos: Mad-homology 1 (MH1), Linker (L) y Mad-homology 2 (MH2) (5, 8, 10) (Figura 1). El dominio MH1 está altamente conservado en Smad4 y todas las R-Smads y está situado en el extremo amino terminal de estas proteínas. En las R-Smads y Smad4, este dominio posee la función de unirse directamente al DNA, excepto para Smad2, que contiene un fragmento de proteína adicional (exón 3) que lo impide (5, 8, 10, 11) (Figura 1). El contacto con el DNA se produce primeramente a través de una estructura de horquilla-β dentro del mencionado dominio. El dominio MH1 también media la interacción con factores de transcripción (Figura 1). Sólo en el caso de las R-Smads, este dominio además inhibe la actividad funcional del dominio MH2: el dominio MH1 de las R-Smads interacciona con su dominio MH2 impidiendo su asociación con Smad4. La fosforilación en el dominio MH2, a consecuencia de la estimulación con TGFβ, impide esa interacción quedando el dominio MH2 libre para ejercer su actividad funcional, lo que permite su unión con Smad4 (5, 8, 10). El dominio MH2 está situado en el extremo carboxilo terminal y está conservado en todas las Smads. En concreto, las R-Smads contienen la secuencia SSXS que es directamente fosforilada por el receptor tipo I de TGFβ (5, 8, 10) (Figura 1). Este dominio es responsable de las interacciones Smad-Smad, R-Smad-receptores, R-Smad-SARA y de otras muchas interacciones en el núcleo con factores de transcripción, coactivadores y correpresores. MH2 es el dominio efector de la proteína y es requerido junto con la porción carboxilo terminal del dominio Linker para la actividad transcripcional de las R-Smads y Smad4 (5, 8, 10) (Figura 1). El dominio Linker, situado entre los dominios MH1 y MH2, es una región rica en prolinas y es el dominio menos conservado en las Smads. Este dominio posee el motivo PY, una zona de unión para las ligasas de ubiquitina, y diferentes sitios de fosforilación para diversas clases de quinasas de proteínas (5, 8, 10) (Figura 1). Las I-Smads están estructuralmente relacionadas con las R-Smads y Smad4 en su dominio MH2 pero tienen sólo una débil homología con el resto de las Smads en el extremo amino terminal (5) (Figura 1).

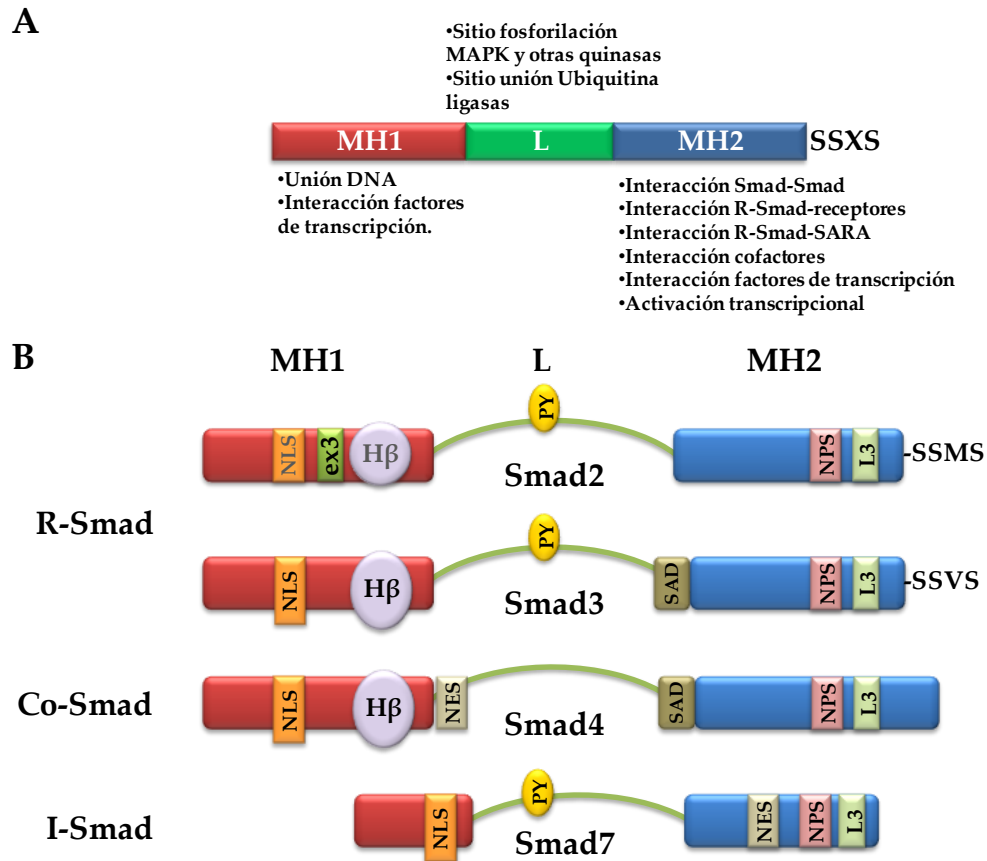


Figura 1. Las proteínas Smad. A. Diferentes dominios de las Smads. Se detalla la función de cada uno de ellos. B. Dominios de las Smads con sus diferentes motivos. NLS: Señal de localización nuclear. ex3: exón 3. H β : Horquilla- β . PY: dominio PY. NES: Señal de exportación nuclear. SAD: Dominio de activación de las Smads. NPS: Señal de nucleoporo. L3: bucle L3. SSMS y SSVS: secuencia SSXS de Smad2 y Smad3, respectivamente, donde M es metionina y V valina. Los dominios NLS y H β de Smad2 se representan sombreados, lo que indica su falta de función debido a la presencia del exón3.

I.2. Señalización de TGF β .

I.2.1. Ruta canónica de la señalización de TGF β .

TGF β es sintetizado como una molécula precursora, denominada TGF β latente, que es dirigida a la matriz extracelular. La molécula de TGF β latente es un sensor que responde a las perturbaciones extracelulares y asocia estos eventos con su activación. Se han descrito muchos activadores del TGF β latente, todos ellos tienen en común que son indicadores de perturbaciones de la matriz extracelular. La activación del TGF β latente se produce por activación proteolítica, por integrinas, por thrombospondina-1,

por especies reactivas de oxígeno y por pH, entre otros (12). Ya que tanto TGFβ como sus receptores están presentes en la mayoría de las células, la activación de TGFβ es probablemente un paso crítico regulador en la acción de esta citoquina (4).

Los diferentes miembros de la superfamilia de TGFβ señalizan a través de combinaciones características de diferentes receptores tipo I y II. En vertebrados se conocen siete receptores tipo I, también llamados Activin receptor like kinase (ALK 1 a 7) y cinco tipo II (TβRII, ActRII, ActRIIB, BMPRII y AMHRII) (Figura 2). Los dos tipos de receptores contienen un dominio amino terminal extracelular de unión a

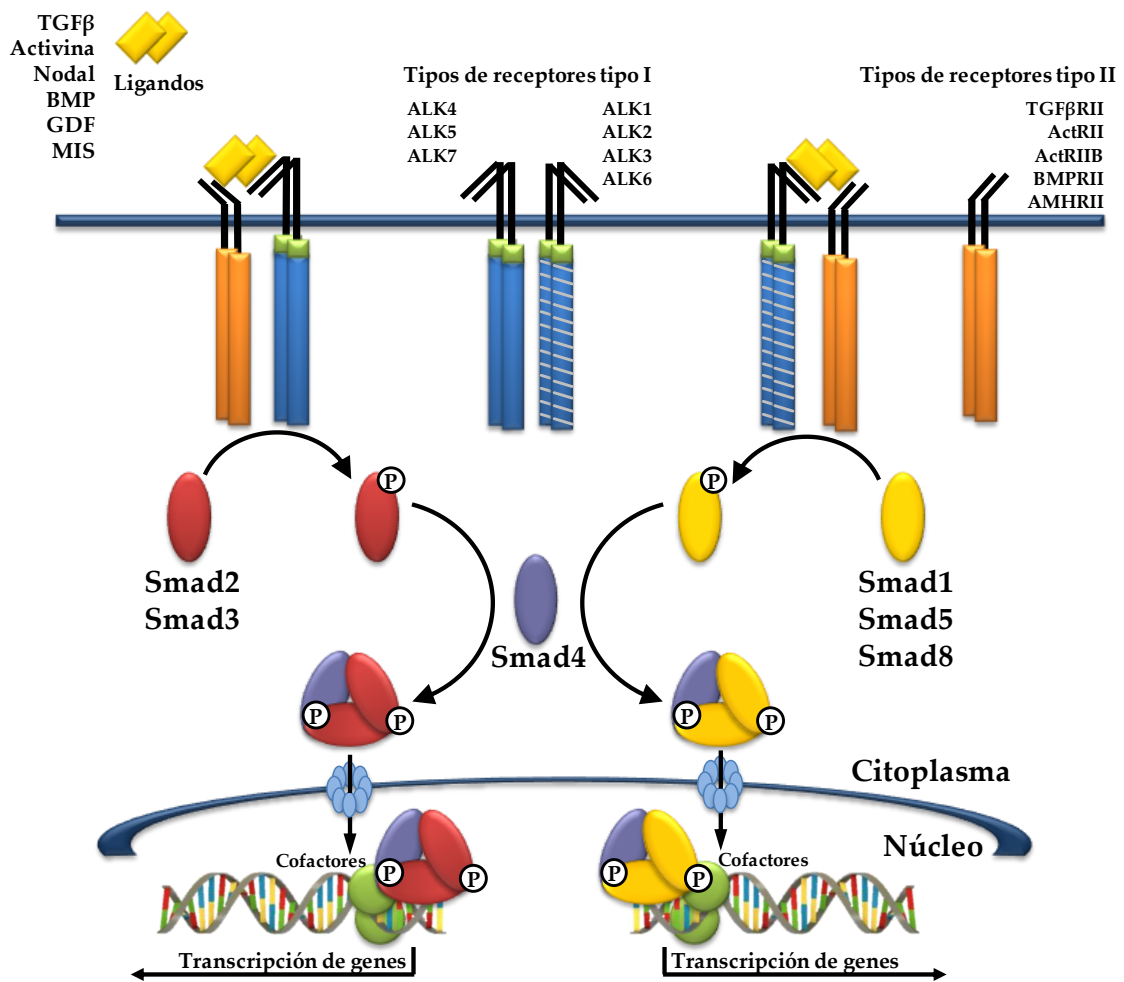


Figura 2. Los diferentes ligandos de la superfamilia de TGFβ utilizan diferentes rutas de señalización. Los diferentes ligandos de la superfamilia TGFβ señalizan a través de diferentes combinaciones de receptores tipo I y II características: receptor tipo II junto con ALK4, ALK5 ó ALK7 para señalizar a través de las R-Smads, Smad2 y Smad3, o receptor tipo II junto con ALK1, ALK2, ALK3 ó ALK6 para señalizar a través de las R-Smads, Smad1, Smad5 y Smad8. Se detallan los diferentes receptores tipo I y tipo II de la superfamilia de TGFβ y las R-Smads asociadas a su señalización en cada uno de los casos.

ligando, una región transmembrana y un dominio citoplasmático con actividad serina/treonina quinasa (2, 5). En términos generales, se ha descrito que la subfamilia de TGF β /Activina/Nodal señala a través de los receptores ALK4, ALK5 y ALK7 y las R-Smads, Smad2 y Smad3. Por otro lado, la subfamilia BMP-GDF-MIS señala a través de los receptores ALK1, ALK2, ALK3 y ALK6 y las R-Smads, Smad1, Smad5 y Smad8. Aunque la asociación de receptores y R-Smad es generalmente válida, la división de los miembros de la superfamilia de TGF β en dos grupos cerrados atendiendo a la unión a determinados tipos de receptores es demasiado simplista. De hecho, existen numerosas excepciones, siendo erróneo la asignación a un ligando particular al grupo de los receptores ALK4, ALK5 y ALK7 ó ALK1, ALK2, ALK3 y ALK6 (1, 6) (Figura 2). Concretamente, las tres isoformas de TGF β señalizan a través del receptor de TGF β tipo II (T β RII) en asociación con ALK1, ALK2 para fosforilar a Smad1 y Smad5 ó con ALK5 para fosforilar a Smad2 y Smad3. En la mayoría de tipos celulares, ALK5 (también llamado receptor de TGF β tipo I, T β RI) es el receptor tipo I predominante, el cual es activado por TGF β a través del T β RII fosforilando Smad2 y Smad3 (3). Además de los receptores tipo I y tipo II, existen los llamados receptores accesorios que pueden ser requeridos para una apropiada señalización. Entre ellos destacan, TGF β RIII/betaglycan, Endogлина/CD10, EGF-CFC family y BAMBI (13).

La señalización de TGF β es mediada a través de la unión del ligando a un complejo receptor heterotetramérico formado por dos receptores tipo I y dos receptores tipo II (Figura 3). La unión del ligando al T β RII estimula la formación del complejo receptor heterotetramérico que facilita que la quinasa del receptor tipo II, que está constitutivamente activa, fosforee al T β RI en el dominio GS, una región rica en residuos de glicina y serina, lo que activa la quinasa del receptor tipo I (2, 5, 13) (Figura 3). Una vez activado, el T β RI (ALK5) fosforila a los mediadores intracelulares de la señalización de TGF β , las R-Smads (Smad2 y Smad3) (1, 2, 5) (Figura 3). Tras la unión del ligando, el complejo ligando-receptor heterotetramérico pueden ser internalizado vía vesículas cubiertas de clatrina a endosomas tempranos junto con Smad2/Smad3. La interacción entre ALK5 y las R-Smads es facilitada por la proteína Smad anchor for receptor activation (SARA), proteína localizada en endosomas tempranos donde interacciona con los receptores de TGF β y las Smads (14, 15). La

proteína citoplasmática promyelocytic leukemia tumor suppressor (PML) interacciona con Smad2/Smad3 y SARA, siendo requerida para la asociación de Smad2/Smad3 con SARA y para la acumulación de SARA y los receptores de TGFβ en endosomas tempranos (16). La molécula adaptadora Dab2 también facilita la interacción entre el receptor y las R-Smads (17). La fosforilación de las R-Smads, mediada por el receptor, causa una bajada en la afinidad de SARA por dichas proteínas con la consecuente formación de los complejos homoméricos y heteroméricos con la Co-Smad, Smad4 (14, 18) (Figura 3). Estos complejos se translocan al núcleo donde regulan, junto con otros factores de transcripción, la transcripción de gran variedad de genes (5, 19) (Figura 3).

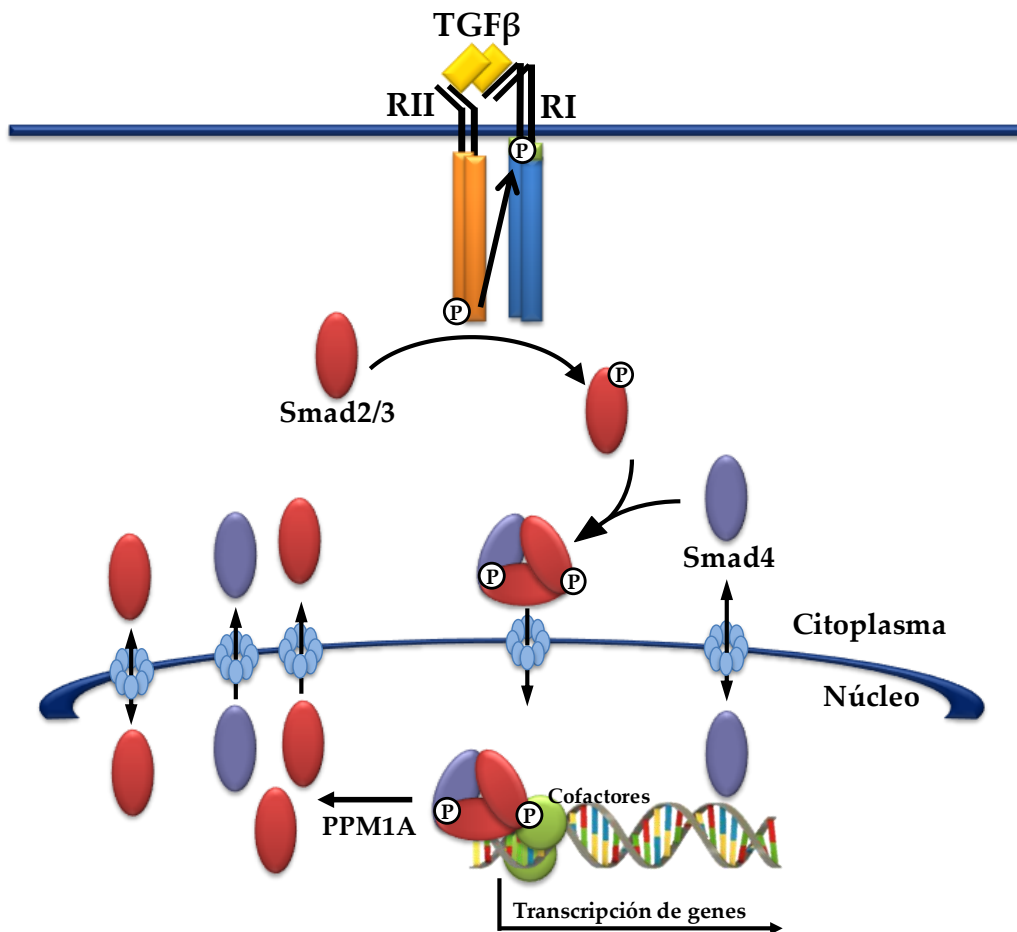


Figura 3. Ruta de señalización de TGFβ. La unión de TGFβ al TβRII estimula la formación del complejo receptor heterotetramérico que permite que la quinasa del receptor tipo II fosforile al TβRI en el dominio GS, activando a la quinasa del receptor tipo I. Una vez activado, ALK5 fosforila a Smad2 y Smad3. La fosforilación de las R-Smads, mediada por el receptor, provoca cambios conformacionales que llevan a su disociación del TβRI con la consecuente formación de los complejos homoméricos y heteroméricos con Smad4. Estos complejos viajan al núcleo donde, junto con otros factores de transcripción, regulan la transcripción de gran variedad de genes.

I.2.2. Transporte nucleocitoplasmático de las Smads.

Las Smads entran y salen del núcleo en ausencia de estimulación con TGF β (20, 21) (Figura 3). En células no inducidas con TGF β , Smad4 está igualmente distribuida entre el citoplasma y el núcleo, mientras que las R-Smads tienen una localización mayoritariamente citoplasmática. En células HaCaT, tras la estimulación con TGF β , los complejos formados por las R-Smads y Smad4 se acumulan en el núcleo máximamente a los 45 minutos de estimulación y permanecen nucleares durante 4 ó 5 horas, tras las cuales comienzan a relocalizarse al citoplasma (20-22). Las R-Smads fosforiladas son desfosforiladas en el núcleo, lo que permite su disociación de Smad4 y su exportación al citoplasma. La fosfatasa involucrada en la desfosforilación de Smad2 y Smad3 es PPM1A (24). Si los receptores siguen activos, se reinicia el ciclo en el que las R-Smads son fosforiladas, forman complejos con Smad4 y vuelven al núcleo. Si, por el contrario, los receptores no están activos, las Smads se acumulan en el citosol (22, 23) (Figura 3). De esta manera, el hecho de que las Smads estén continuamente entrando y saliendo del núcleo provee un mecanismo por el cual las Smads reflejan directamente el número de receptores activos y por lo tanto se detecta la concentración de TGF β (23) (Figura 3).

El transporte nucleocitoplasmático ocurre a través de un canal hidrofóbico en la membrana nuclear que se denomina complejo del poro nuclear (NPC). En células de mamíferos, el NPC está formado por aproximadamente 30 nucleoporinas diferentes (25). La translocación del sustrato a través del poro nuclear es frecuentemente mediada por receptores de transporte llamados carioferinas e implica un gasto de energía. Dependiendo de la dirección del transporte, las carioferinas son clasificadas en importinas y exportinas (22). La mayoría de las veces, la importación nuclear de una proteína está dirigida por una señal de localización nuclear (NLS) en la secuencia de aminoácidos de la proteína. La clásica señal NLS es una agrupación de residuos aminoacídicos básicos. Un segundo tipo, la señal NLS bipartida, consiste en dos tramos de aminoácidos básicos separados por una zona de 10 a 12 aminoácidos (26). La exportación de proteínas del núcleo es mediada por la señal de exportación nuclear (NES) que es una secuencia de aminoácidos que contienen residuos hidrofóbicos como leucina e isoleucina (26). El mecanismo de importación al núcleo en las Smads es

dependiente de carioferinas y, al menos para Smad3 y Smad4, el motivo NLS, situado en el dominio MH1, es requerido para dicho transporte. Para Smad2, sin embargo, el motivo NLS no es funcional debido probablemente a la presencia del exón 3 (22) (Figura 1). Hasta el momento, el mecanismo de importación de Smad2 no se ha determinado. Por otro lado, se ha descrito un mecanismo de importación para Smad2, Smad3 y Smad4 independiente de carioferinas. En éste, las Smads interaccionan por su dominio MH2 (motivo NPS) (Figura 1) directamente con las nucleoporinas CAN/Nup214 y Nup153, localizadas en la parte citoplasmática y nuclear del poro, respectivamente (22). El mecanismo de exportación de Smad4 al citosol está mediado por el transportador CRM1. El motivo NES situado en la parte amino terminal de la región Linker de Smad4 media dicha exportación (21) (Figura 1). Sin embargo, CRM1 no es el transportador encargado de exportar Smad2 y Smad3. Se han sugerido diversos mecanismos para la exportación de Smad2 y Smad3 tanto dependiente como independiente de carioferinas (22), aunque más trabajos en este campo son necesarios para conocer con precisión los mecanismos de la exportación nuclear de Smad2 y Smad3.

Smad7 tiene una presunta señal NLS en su parte amino terminal y una presunta señal NES en su dominio MH2 (8) (Figura 1). En respuesta a TGFβ, Smad7 es transportada del núcleo al citoplasma donde ejerce su acción inhibitoria. Smad ubiquitin regulatory factor 1 (Smurf1), una ligasa de ubiquitina de tipo E3 que tiene un NES, interacciona con Smad7 e induce la translocación al citoplasma de dicha proteína mediante un mecanismo dependiente de CRM1 (27).

I.2.3. Ruta no canónica de la señalización de TGFβ.

Los receptores de TGFβ pueden estimular rutas adicionales a la de las Smads para regular diversos procesos celulares y fisiológicos. A estas rutas se les conoce como rutas no canónicas. Los receptores de TGFβ fosforilan o interaccionan directamente con efectores no canónicos entre los que se encuentran Mitogen-activated protein kinase (MAPK) (ERK1/ERK2, p38 MAPK y JNK) PI3K, Akt, Src, mTOR, PP2A y GTPasas (Ras, RhoA, Rac y Cdc42), iniciando una señalización paralela que coopera con la vía de las

Smads (28-30) (Figura 4 A). De esta manera, los transductores no canónicos bajo el control de los receptores de TGF β proveen una regulación de la señalización y sirven como nodos de señalización cruzada con otras vías de señalización (28). Las rutas no canónicas tienen dos mecanismos por los cuales interaccionan con la señalización canónica de TGF β (28). Un primer mecanismo es la modificación directa de las Smads por diferentes rutas de señalización independientes de éstas, lo que lleva a la modulación de su actividad (28) (Figura 4 B). Por otro lado, las Smads interaccionan directamente con otras proteínas de señalización, modulando su actividad y transmitiendo la señal a dichas vías de señalización (28) (Figura 4 C). Las rutas de señalización no canónicas contribuyen a incrementar la complejidad de la señalización de TGF β .

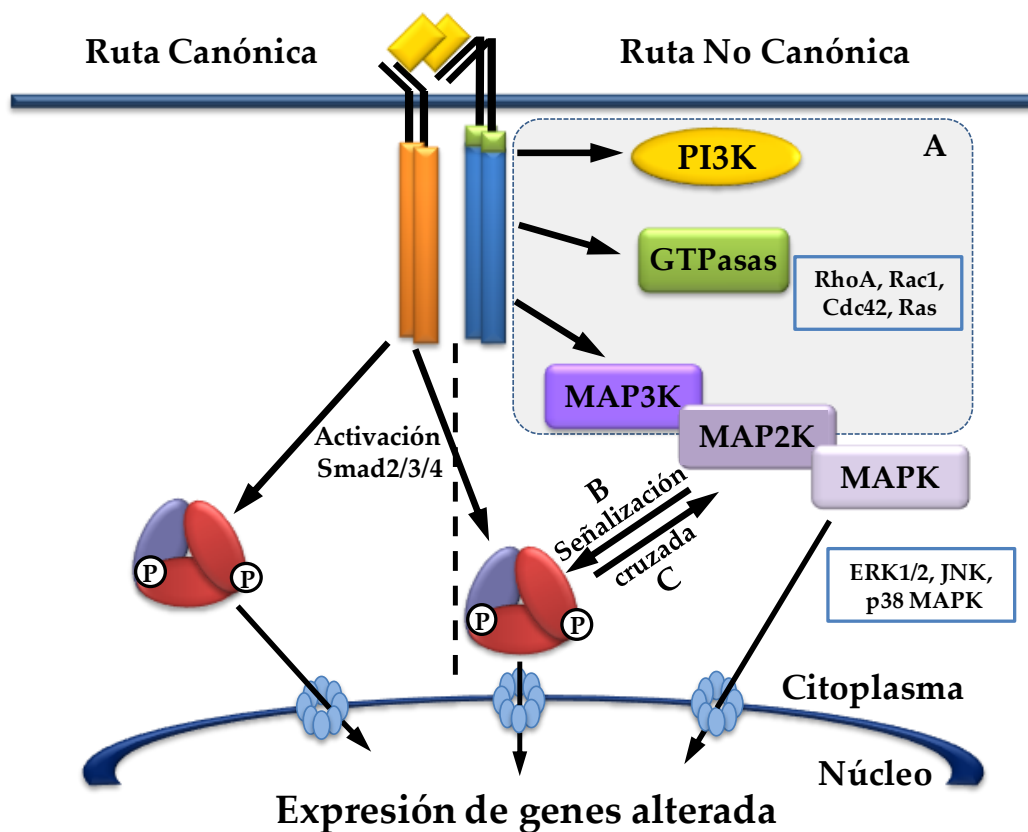


Figura 4. La estimulación de los receptores de TGF β dispara rutas canónicas y no canónicas. A. Los receptores de TGF β fosforilan o interaccionan directamente con efectores no canónicos. B. Diferentes rutas de señalización independientes de las Smads modifican las Smads directamente. C. Las Smads interaccionan directamente y modulan la actividad de otras proteínas de señalización transmitiendo la señal a otras vías.

I.3. Regulación de la señalización de TGF β .

La ruta de señalización de TGF β está implicada en gran variedad de procesos y está rigurosamente controlada por diferentes mecanismos que implican a proteínas que inhiben su señalización a través de diferentes procesos o modificaciones post-traduccionales que modulan dicha señalización (5, 8-10).

I.3.1. Inhibición de la señalización.

Las I-Smads ó Smads inhibitorias juegan un papel clave en la regulación negativa de la vía de señalización de TGF β (9, 10). Smad7, una de las I-Smads, ha sido implicada específicamente en la inhibición de la señalización de TGF β mediante diferentes mecanismos (6, 8, 9) (Figura 5). Smad7 compete con las R-Smads por la unión al receptor tipo I activado, inhibiendo la fosforilación de las R-Smads; Smad7 y el T β RI activado forman un complejo ternario con BAMBI, un pseudorreceptor que sinergiza con Smad7 para antagonizar la señalización de TGF β e interferir con la fosforilación de las Smads (9) (Figura 5). También, Smad7 recluta a las ligasas E3 de ubiquitina, Smurf1 y Smurf2, hacia el T β RI activado provocando su ubiquitinación y posterior degradación (31, 32) (Figura 5). Esta interacción se produce a través del motivo PY del dominio Linker de Smad7. Además de las Smurf, Smad7 también recluta a otras ligasas HECT-E3 de ubiquitina como neural precursor cells expressed, developmentally downregulated 4-2 (NEDD4-2) y WW domain containing E3 ubiquitin ligase 1/TIGF-interacting ubiquitin ligase 1 (WWP1/TiuL1) (Figura 5). También recluta a UbcH7, una enzima conjugada E2 que facilita la degradación del T β RI a través de la ubiquitinación mediada por Smurf2 (9) (Figura 5). En cambio, Smad7 se une a diferentes enzimas deubiquitinasas como USP15 y UCH37 que desubiquitinan y estabilizan el T β RI (33). Por otro lado, Smad7 interacciona con GADD34, la subunidad reguladora de la protein phosphatase 1 (PP1), y la recluta al T β RI activado para desfosforilarlo e inactivarlo (Figura 5). SARA incrementa el reclutamiento de dicha fosfatasa (34). Además, Smad7 interacciona con otras muchas proteínas para regular la actividad y/o estabilidad del T β RI como por ejemplo, serine-threonine kinase receptor-associated protein (STRAP), Sal-inducible kinase (SIK), atrophin1-interacting protein 4 (AIP4), Yes-associated

protein 65 (YAP65), Crk-associated substrate lymphocyte type (Cas-L) y H₂O₂-inducible clone 5 (Hic5) (9) (Figura 5). Por último, Smad7 se une a los Smad binding elements (SBE) a través de su dominio MH2, lo cual interfiere con la formación del complejo R-Smad/Smad4/DNA en los promotores de los genes diana e inhibe la activación de la transcripción dependiente de las Smads (35) (Figura 5). TGF β induce de manera rápida y transitoria la expresión de Smad7 y la movilización del pool de Smad7 nuclear hacia el citoplasma, por lo que juega un papel muy importante en la limitación de la duración de la señal a través de un bucle de retroalimentación negativa (36).

Además de las I-Smads, se han descrito numerosas proteínas que inhiben la señalización de TGF β (8, 10). Entre todas ellas, podemos destacar a TMEPAI que inhibe

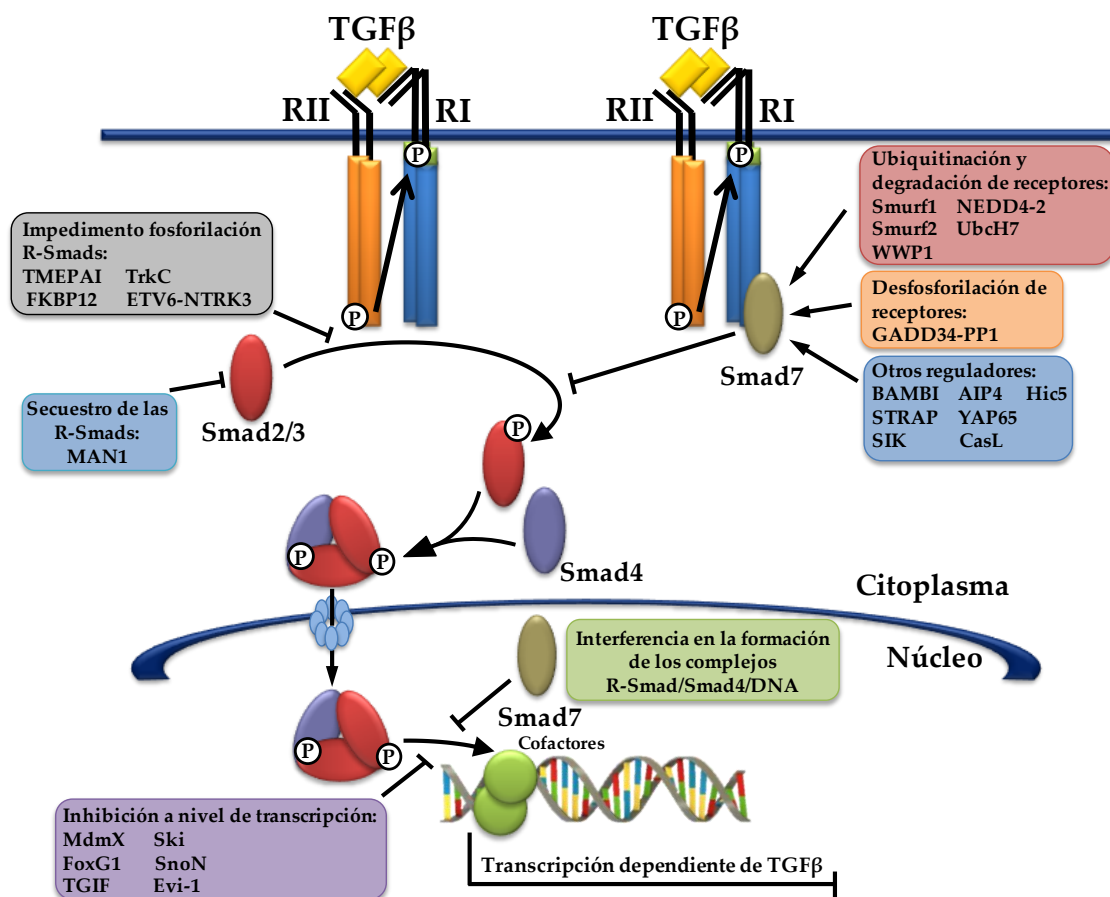


Figura 5. Diferentes proteínas regulan la vía de señalización de TGF β . La vía de señalización de TGF β es regulada en diferentes etapas: receptores de TGF β , Smads y transcripción de DNA. Se indica la etapa de la señalización en la que las diferentes proteínas y mecanismos actúan para la inhibición de la señalización de TGF β .

la activación de las R-Smads impidiendo su unión a SARA (37), mientras que FKBP12 se une al dominio GS del TβRI bloqueando el sitio de fosforilación de esta región (38) (Figura 5). Otras proteínas como TrkC y ETV6-NTRK3 interactúan con el TβRII previniendo su interacción con TβRI lo que inhibe la señalización de TGFβ (33) (Figura 5). Ciertas proteínas, como MAN1, secuestran a las R-Smads inhibiendo su activación y asociación con Smad4 (39) (Figura 5). Otras como MdmX y FoxG1, sin embargo, interrumpen la transactivación de los complejos Smad activos (10) (Figura 5). Por último proteínas como TG-interacting factor (TGIF), Ski, SnoN y Evi-1 inhiben la señalización de TGFβ mediante la interacción y el reclutamiento de complejos correpresores, muchos de ellos con actividad desacetilasa de histonas, entre otros mecanismos (este aspecto se tratará exhaustivamente más adelante en esta introducción, apartado I.4.2) (10) (Figura 5).

I.3.2. Regulación de la señalización de TGFβ mediante modificaciones post-traduccionales.

Las modificaciones post-traduccionales de los factores de transcripción son muy importantes para la modulación de su actividad transcripcional (5). Las proteínas de la ruta de señalización de TGFβ están moduladas por diferentes modificaciones post-traduccionales que influyen en su actividad transcripcional y su estabilidad:

1. Fosforilación. La fosforilación es una modificación post-traduccional que consiste en la adición de un grupo fosfato en un residuo de serina, treonina o tirosina de una proteína. Este proceso lo llevan a cabo enzimas llamadas quinasas y es revertido por enzimas denominadas fosfatasas.

Tras la estimulación con TGFβ, la fosforilación en el extremo carboxilo terminal de las R-Smads, producida por el receptor serina-treonina quinasa TβRI, es un paso crucial en la señalización y regulación transcripcional de TGFβ (Figura 6). Para dicha fosforilación, el TβRI interactúa a través del bucle L45 con el bucle L3 y la α-hélice1 adyacente del dominio MH2 de las R-Smads (40) (Figura 1), lo que provoca la fosforilación del extremo carboxilo terminal del dominio MH2 en la secuencia SSMS o

SSVS de Smad2 y Smad3, respectivamente. Dicha fosforilación se produce en los residuos de serina que rodean el aminoácido hidrofóbico (41-43), y lleva a cambios conformacionales en la proteína que permiten su disociación del T β RI. La fosforilación de las R-Smads genera una cola ácida que se une a un bolsillo básico situado en el dominio MH2 de Smad4 y que favorece su interacción (44). Posteriormente, los complejos triméricos formados con Smad4 se translocan al núcleo y regulan la transcripción de gran diversidad de genes (19). PPM1A es la fosfatasa encargada de desfosforilar a Smad2 y Smad3 en el núcleo y promueve la exportación nuclear de estas proteínas, limitando la duración de la actividad de las R-Smads en el núcleo (24).

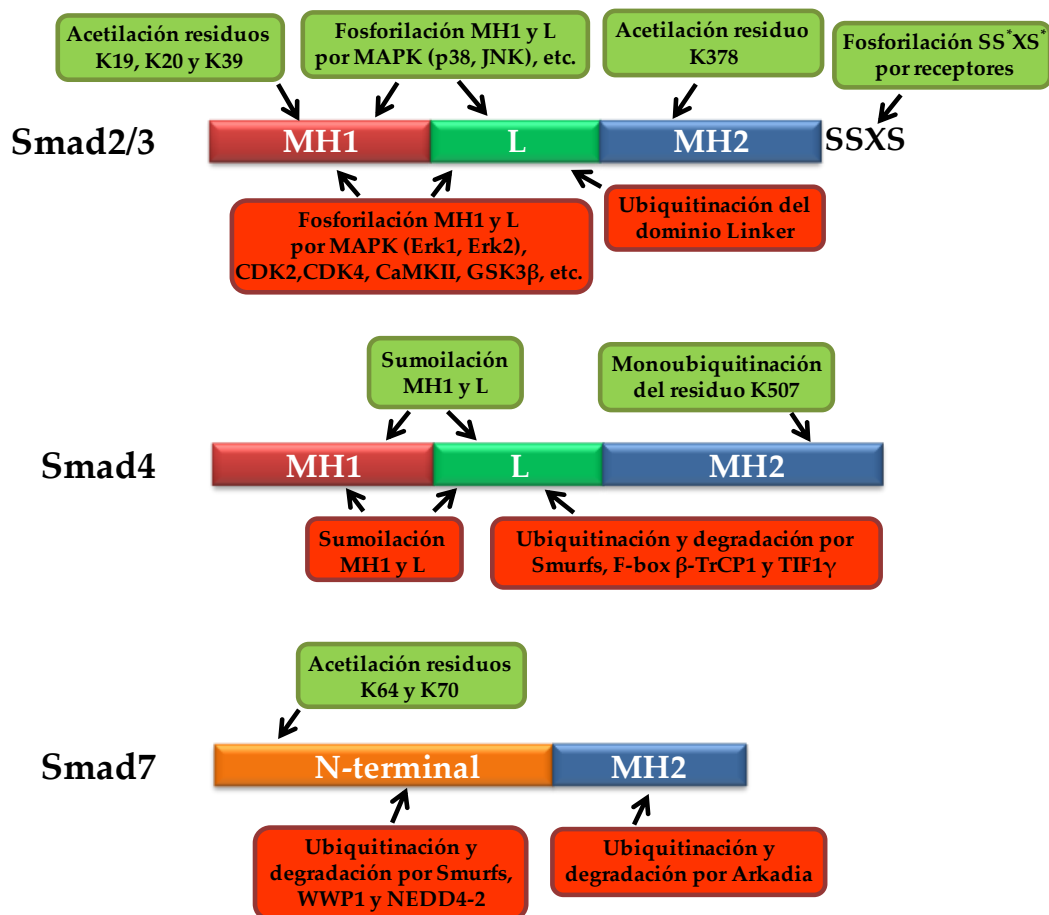


Figura 6. Diferentes proteínas modifican post-traduccionamente las proteínas Smad. Se detallan las diferentes modificaciones post-traduccionales a las que son sometidas las R-Smads, Smad4 y Smad7. Se indica en color verde o rojo si el efecto de la modificación post-traduccional es positivo o negativo, respectivamente, sobre la regulación de la vía de señalización de TGF β .

Las R-Smads no sólo son fosforiladas en el dominio MH2. Las R-Smads y Smad4 son fosforiladas por MAPK como Erk1, Erk2, p38 y JNK mayoritariamente en el dominio Linker, aunque ha sido también descrita en el dominio MH1 para Smad2 (5). El efecto de dichas fosforilaciones es muy diverso, teniendo efectos tanto positivos como negativos para la transcripción dependiente de TGFβ (Figura 6). Así, la fosforilación de Smad2 y Smad3 por p38 y JNK en el dominio Linker incrementa la activación transcripcional de genes reporteros sensibles a TGFβ, mientras que la fosforilación por Erk1 y Erk2 inhibe la actividad transcripcional y la acumulación nuclear de Smad2 y Smad3 (5) (Figura 6). Por otro lado, Smad2 y Smad3 también son fosforiladas por otras quinasas como ciclin-dependent kinase 2 (CDK2), CDK4 y calcium-calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) en los dominios MH1 y Linker. Esta fosforilación inhibe su actividad transcripcional. GSK3β fosforila el dominio MH1 de Smad3 causando su ubiquitinación y degradación (8) (Figura 6). Por último, la desfosforilación de los residuos de serina y treonina de los dominios MH1 y Linker de las R-Smads por las fosfatasas SCP (SCP1-3) incrementan la actividad transcripcional dependiente de TGFβ (5, 45).

2. Acetilación. La acetilación es una modificación post-traduccional que consiste en la adición de un grupo acetilo en los residuos de lisina de la proteína diana. Este proceso lo llevan a cabo varias enzimas acetiltransferasa de histonas (HAT): p300, CBP y P/CAF. La eliminación del grupo acetilo es catalizada por las enzimas desacetilasas de histonas (HDAC) (46, 47). Un ejemplo de regulación por acetilación lo tenemos en las proteínas histonas (se comentará más adelante en esta introducción, apartado I.4.2) (46). Además de las histonas, existen proteínas no histónicas que pueden ser acetiladas por estas enzimas. Dicha modificación afecta a su interacción con el DNA, a su interacción con otras proteínas, a su estabilidad, etc. Diversas proteínas de la señalización de TGFβ como Smad7, Smad2 y Smad3 pueden ser acetiladas.

Smad7 interacciona a través de su dominio MH2 con el coactivador transcripcional p300, una enzima con actividad HAT, resultando en la acetilación de los dos residuos K64 y K70 en su extremo amino terminal. En respuesta a la señalización de TGFβ, la acetilación de Smad7 disminuye lo que induce su degradación

vía proteosoma. La acetilación de los residuos K64 y K70 protege a Smad7 de la ubiquitinación de estos mismos residuos de lisina e impide su posterior degradación estimulada por TGF β y mediada por Smurf1 (48) (Figura 6). Varias son las HDAC que interaccionan con Smad7 y la desacetilan, entre ellas se encuentran HDAC 1, 3 y 6. La desacetilación mediada por dichas HDAC aumenta la ubiquitinación de Smad7 contribuyendo a su degradación vía proteosomal (49). Adicionalmente, se ha descrito que Sirt1, una HDAC de clase III, interacciona con Smad7 a través de su extremo amino terminal desacetilándola en los residuos K64 y K70 (50). Dicha desacetilación aumenta la ubiquitinación mediada por Smurf1 y por tanto la degradación de Smad7 en células mesangiales murinas (50). El balance entre acetilación y desacetilación, tienen una consecuencia sobre la ubiquitinación y se ha postulado como un mecanismo para regular la estabilidad de Smad7 (48-50).

El dominio MH2 de Smad2, Smad3 y Smad4 interacciona con el dominio carboxilo terminal de p300/CBP, lo que dota de actividad transcripcional al complejo de las Smads (51-53). La interacción entre p300 y las Smads es esencial para la función transactivadora del dominio MH2 de las R-Smads y en definitiva para la transcripción inducida por TGF β , debido en parte a su actividad acetiltransferasa sobre histonas específicas (53). Además, como respuesta a TGF β , Smad2 es acetilada por p300/CBP y PCAF (54, 55) en los residuos de lisina 19, 20 y 39 del dominio MH1 (55) (Figura 6). Dicha acetilación tiene lugar predominantemente en el núcleo (55). La acetilación de Smad2 no afecta a su estabilidad, ni a la oligomerización con Smad4, ni a su habilidad de unión al DNA, sin embargo, promueve su acumulación nuclear en respuesta a TGF β al decrecer su exportación nuclear. Además, dicha acetilación es necesaria para la activación transcripcional de Smad2 dependiente de TGF β (55) (Figura 6). De hecho, tras la estimulación con TGF β , se detecta Smad2 acetilada en promotores de genes diana de TGF β como *PAI-1* y *p21*, y dicho reclutamiento coincide con un incremento de p300 y PCAF a los mencionados promotores (54). La acetilación de Smad2 mediada por p300 y TGF β aumenta con el tratamiento de Trichostatin A (TSA), un inhibidor de desacetilasas tipo I y II (54-56). Esto sugiere que la acetilación es reversible y puede ser mediada por HDAC (54, 55), aunque hasta el momento no se ha descrito la desacetilasa involucrada en la desacetilación de Smad2. La fosforilación y la acetilación de Smad2

son dos eventos independientes. Aunque la fosforilación de Smad2 es necesaria para su translocación al núcleo, una vez en el núcleo la acetilación de Smad2 puede ocurrir independientemente del estado de fosforilación de Smad2 (55). Smad3 también es acetilada por p300/CBP. La acetilación de Smad3 ha sido descrita en los residuos de lisina 19 del dominio MH1 y 378 del dominio MH2, aunque dicha acetilación es más débil que la encontrada en Smad2 (54, 57) (Figura 6). La acetilación de Smad3 es estimulada por TGF β y regula positivamente su actividad transcripcional (54, 57) (Figura 6). Recientemente ha sido descrita la proteína Sirt1 como una desacetilasa para Smad3 (58).

3. Ubiquitinación. La ubiquitinación es una modificación post-traduccional que consiste en la unión covalente de una o más moléculas de ubiquitina a un residuo de lisina de la proteína diana. La función más reconocida de la poliubiquitinación es la del marcado de proteínas para su posterior degradación vía proteosoma (59). Este proceso se lleva a cabo mediante la actuación secuencial de tres enzimas: enzima activadora de ubiquitina E1, enzima conjugadora de ubiquitina E2 y ligasa de ubiquitina E3. La ligasa de ubiquitina E3 juega un papel crucial en el reconocimiento específico del sustrato. Existen dos clases funcionales de las enzimas E3 ligasas: E3 ligasas con dominio RING, que funcionan como proteínas adaptadoras, y E3 ligasas con dominio HECT, que catalizan la transferencia de la ubiquitina de la enzima E2 al sustrato (5, 59). La eliminación de la molécula de ubiquitina es catalizada por las deubiquitinasas (DUB). La ubiquitinación es importante en la regulación de los componentes de la señalización de TGF β , incluidos las R-Smads, Smad4 y las I-Smads.

De las E3 ligasas que interaccionan con las R-Smads, se conocen diversas con dominio HECT y al menos una con dominio RING. Entre las HECT E3 ligasas cabe destacar Smurf2 y dos proteínas relacionadas con las Smurfs, NEDD4-2 y WWP1/TiuL1, las cuales interaccionan a través de sus motivos WW con el motivo PY situado en la dominio Linker de las Smads (5). Todas estas ligasas de ubiquitina regulan negativamente la señalización de TGF β a través de la degradación de las R-Smads (Figura 6). Por la parte de las RING E3 ligasas, ROC1, una proteína que forma

parte de Skp/cullin/E-box (SCF), se une a Smad3 causando su ubiquitinación y degradación (5).

Las I-Smads interaccionan a través de su motivo PY en su dominio Linker con diferentes E3 ligasa con dominio HECT como son Smur1, Smurf2, WWP1 y NEDD4-2 (5, 60) (Figura 6). Aunque la interacción de Smad7 con Smurf2 aumenta la ubiquitinación de Smad7 y puede mediar una escasa degradación, su objetivo principal es la ubiquitinación y degradación del complejo Smad7-complejo receptor de TGF β (5). La ligasa E3 Arkadia también interacciona con Smad7 a través de su dominio MH2 provocando la degradación Smad7 (5, 60) (Figura 6).

Smad4, al igual que el resto de Smads, también es ubiquitinada y degradada mediante su unión a las Smurfs (5, 10) (Figura 6). Sin embargo, Smad4 puede interaccionar directamente con otras E3 ligasas, entre las cuales se encuentra la proteína F-box β -TrCP1, componente del complejo SCF E3 ligasa, y ectodermina (TIF1 γ), que ubiquitan y degradan a Smad4 (5) (Figura 6). La ubiquitinación de Smad4, además de controlar su estabilidad, también modula su actividad. Smad4 es mono/oligo-ubiquitinada en el residuo de lisina 507 del dominio MH2, lo que tiene un efecto positivo en la formación del complejo R-Smad/Smad4 y la activación transcripcional de Smad4 (5) (Figura 6).

4. Sumoilación. La sumoilación es una modificación post-traducciona que consiste en la unión covalente de un polipéptido llamado small ubiquitin-like modifier (SUMO) a un residuo de lisina de la proteína diana mediante un mecanismo análogo a la ubiquitinación. Este proceso se lleva a cabo mediante la actuación secuencial de tres enzimas: enzima E1, enzima E2 y enzima ligasa E3. A diferencia de la ubiquitinación, la sumoilación no tiene efectos sobre la degradación vía proteosoma sino que regula la interacción proteína-proteína, la localización subnuclear, la interacción proteína-DNA, la actividad enzimática y la degradación dependiente de ubiquitina (61).

Smad4 interacciona tanto con Ubc9 como con SUMO-1, dos enzimas conjugadas SUMO E2. La sumoilación de Smad4 por parte de estas enzimas es realizada en el dominio MH1 y Linker de Smad4. Dicha sumoilación parece tener un efecto

ambivalente sobre la transcripción regulada por TGF β , activando o reprimiendo la transcripción (5) (Figura 6).

En las proteínas Smad, la acetilación y la sumoilación compiten por los mismos residuos de lisina que la ubiquitinación, generando una regulación compleja de la estabilidad de las Smads (5, 8).

I.4. Transcripción regulada por las Smads.

I.4.1. Propiedades de unión al DNA de las Smads y sus cofactores.

Una vez en el núcleo, los complejos de las Smads se unen a elementos promotores para regular la transcripción de gran variedad de genes (62). Las Smads interaccionan con factores unidos al DNA o se unen directamente a elementos específicos de DNA para regular la transcripción de genes. En ambas situaciones se produce la incorporación de coactivadores y correpresores que modifican la estructura de la cromatina y/o reclutan la maquinaria basal de transcripción (63).

Smad4 y todas las R-Smads, excepto Smad2, pueden unirse al DNA a través de su dominio MH1. La horquilla- β situada en el dominio MH1 de todas las Smads es responsable de la interacción de las Smads con el DNA. Dicha horquilla, conservada en todas las R-Smads y Smad4, no confiere selectividad a la unión con los diferentes genes diana (10). Las Smads se unen a los SBE, una secuencia característica de DNA que consta de varias repeticiones de la secuencia AGAC o su complementaria GTCT, para regular la transcripción. También las Smads se unen a secuencias ricas en GCs para regular la transcripción de determinados genes (5). Muchas regiones promotoras de genes regulados por las Smads contienen una o más secuencias SBE. La afinidad de las Smads por estos sitios es baja y se necesitan múltiplos de SBE para estimular la activación por TGF β . Además, las proteínas Smads necesitan sinergizar con diversos cofactores de unión al DNA, que le confiere una mayor afinidad y especificidad en el reclutamiento al DNA y en el reconocimiento de genes diana (5). De esta manera, la interacción con diferentes factores de transcripción permite a las Smads unirse a

diferentes promotores y mediar un programa de activación o represión transcripcional específico en respuesta a TGF β (5).

Las Smads se unen a numerosos factores de transcripción para controlar la expresión de determinados genes. Los primeros identificados fueron FoxH1 y FoxH1b, previamente denominados Fast-1 y Fast-3, respectivamente. Estos factores reclutan al complejo Smad2/Smad4 a una secuencia de un elemento regulador del promotor del gen *Mix.2* de *Xenopus laevis* denominada activin response element (ARE) (64-66). Smad2 se une a través de su dominio MH2 a una región rica en prolinas denominada dominio SIM presente en FoxH1 y FoxH1b y al dominio FM, un dominio específico de FoxH1 (67). La presencia de FoxH1 es esencial para la unión de dicho complejo al promotor del gen *Mix.2* y por lo tanto para la activación de la transcripción de dicho gen (64). Perteneciente a la misma familia de factores de transcripción, los factores de transcripción FoxO1, FoxO3 y FoxO4 reclutan Smad3 para activar la transcripción del gen *CDKN1A*. Por otro lado, los factores de transcripción Mixer, Milk (Bix2) y Bix3 reclutan al complejo Smad2/Smad4 a una secuencia de un elemento regulador dentro del promotor del gen *goosecoid* de *Xenopus laevis* denominada distal element (DE) (66, 68). Smad2 se une al dominio SIM del factor de transcripción a través de su dominio MH2. La presencia de Mixer es esencial para la unión de dicho complejo al promotor del gen *goosecoid* y para su activación (66). Otros ejemplos de factores de transcripción que cooperan con las R-Smads en la regulación de determinados genes son ATF3, c-jun, JunB, miembros de la familia de factores de transcripción AP-1, NF- κ B, Runx1, Runx2, Runx3, Sp1, E2F4 y E2F5, entre otros (5, 10, 19).

I.4.2. Regulación de la transcripción por las Smads sobre la cromatina. Coactivadores y correpresores de las Smads.

El nucleosoma es la unidad básica de la cromatina que consiste en 147 pares de bases de DNA enrollado alrededor de un octámero de histonas (H) constituido por dos unidades de cada una: H2A, H2B, H3, H4. Este complejo se denomina núcleo de histonas. La histona H1 se posiciona entre los nucleosomas ayudando a estabilizar y compactar el DNA en fibras de cromatina de 30 nm altamente ordenadas y

transcripcionalmente inactivas (69) (Figura 7). Las histonas que componen el nucleosoma son proteínas básicas que consisten en un dominio globular y una cola amino terminal que sobresale del nucleosoma. Dichas colas no presentan una estructura definida y son diana de diferentes modificaciones post-traduccionales: acetilación, fosforilación, metilación, sumoilación y ubiquitinación. El patrón de modificaciones que determina la condensación de la cromatina y, por tanto, la regulación de la transcripción se denomina Código de Histonas (46).

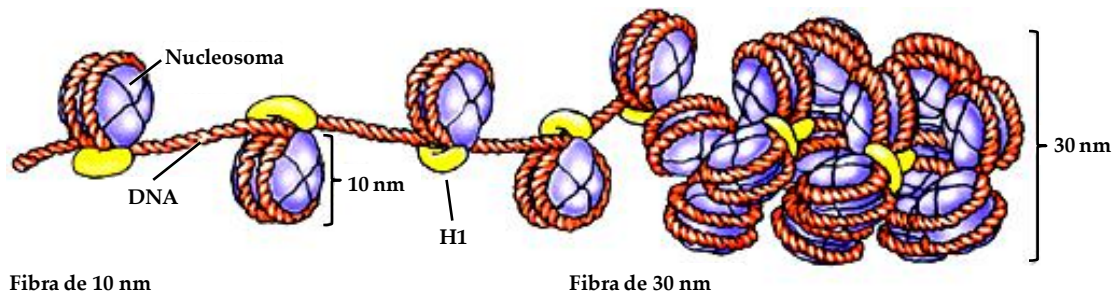


Figura 7. Estructura molecular de los nucleosomas. El DNA, representado en color rojo, se enrolla alrededor del octámero de histonas, representadas en color azul, formando el nucleosoma. La histona H1, representada en color amarillo, se posiciona entre los nucleosomas adyacentes ayudando a estabilizar y compactar el DNA en fibras de cromatina de 30nm altamente ordenadas. Figura tomada de Seitz *et al.* (70).

La cromatina juega un papel muy importante en la regulación de la transcripción pudiendo restringir el acceso de proteínas reguladoras al DNA. La modificación de la estructura de la cromatina por complejos proteicos que modifican post-traduccionalmente las histonas o desplazan la posición de los nucleosomas, es esencial para la regulación de la transcripción. La acetilación de las colas de histonas neutraliza las interacciones electrostáticas entre el DNA cargado negativamente y las colas básicas de histonas, provocando la relajación de la estructura del nucleosoma, lo que lleva a una cromatina más abierta y permisiva para la transcripción. Cuando esto ocurre, se facilita el acceso al DNA de factores de transcripción y la maquinaria de transcripción (5, 46, 71, 72). Sin embargo, la desacetilación de dichos residuos provoca un aumento de la interacción entre el DNA y las colas de las histonas, dificultando el proceso de transcripción (46, 71, 72). La acetilación de las colas de histonas es también reconocida por factores específicos como reguladores de la transcripción o por actividades de remodelación ATP-dependientes (71).

Además de los factores de transcripción, las Smads cooperan e interactúan con coactivadores y correpresores que poseen actividades que modifican la cromatina o que pueden reclutar componentes de complejos remodeladores de cromatina, determinando de este modo la magnitud de la activación de la transcripción dependiente de TGF β y las Smads (63). CBP y p300 son dos coactivadores que poseen actividad HAT y juegan un papel muy importante en la regulación de la transcripción dependiente de TGF β . Smad2 y Smad3 interactúan con CBP-p300 a través de su dominio MH2 (51, 52). Smad3, al igual que Smad4, contiene dentro de su dominio Linker la región Smad activating domain (SAD) que interactúa con p300 (73, 74) (Figura 1). La interacción de las Smads con p300 es esencial para la actividad transcripcional que aporta el complejo de las Smads (53). CBP y p300 actúan como coactivadores de la señalización de TGF β modulando la actividad de las Smads por acetilación de las Smads y mediante la acetilación directa de histonas. p300 es reclutado a promotores dependientes de Smad2 y específicamente acetila los residuos de lisina 9 y 18 de la histona H3 (53). Adicionalmente, Smad2 también recluta a Brg1, un componente ATPasa del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF, lo que es requerido para la activación transcripcional de TGF β mediada por Smad2 (53). Así, el complejo activo que contiene Smad2 no activa la transcripción reclutando directamente la maquinaria de transcripción a los promotores de DNA como otros de factores de

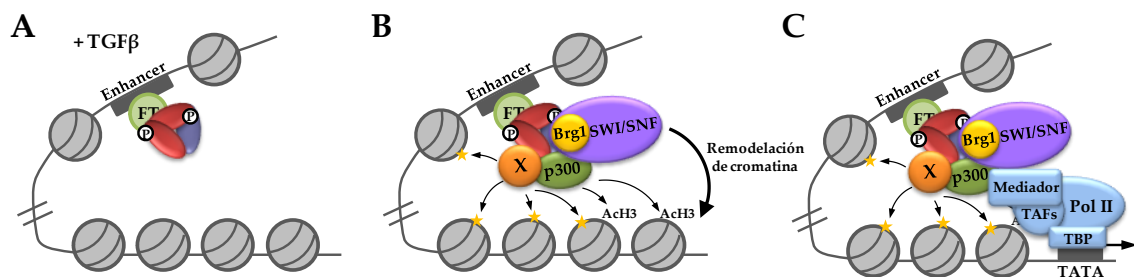


Figura 8. Las Smads regulan la transcripción mediante la remodelación de la cromatina. A. En respuesta a TGF β , los complejos que contienen Smad2 fosforilada son reclutados a los promotores por factores de transcripción (indicados con FT). B. Dicho complejo recluta p300, SWI/SNF y probablemente otros factores (indicados con una X) para modificar y remodelar la cromatina (indicado por AcH3 y una estrella para modificaciones desconocidas). C. La cromatina modificada y remodelada, y los complejos que contienen Smad2 fosforilada reclutan la maquinaria de transcripción de la RNA polimerasa II a los promotores para activar la transcripción. Mediador: complejo mediador. TAFs: diferentes proteínas TAF involucradas en la maquinaria basal de transcripción. Pol II: RNA polimerasa II. TBP: TATA binding protein, proteína que se une a la secuencia TATA.

transcripción, sino que la recluta de manera indirecta a través de la modificación de histonas y remodelación de la cromatina generada por p300, Brg1 y probablemente otras enzimas (5, 53) (Figura 8). Por tanto, a diferencia de otros factores de transcripción, Smad2 sólo es capaz de activar la transcripción sobre cromatina y no sobre DNA desnudo (53). Existen otros coactivadores que han sido implicados en la regulación de la transcripción dependiente de las Smads. Algunos tienen actividad HAT como PCAF y GCN5, y otros potencian la transcripción de una manera p300/CBP dependiente como MSG1 y SRC1. ARC105/MED, componentes del complejo mediador, interaccionan con Smad2 y Smad3 y reclutan la maquinaria de RNA polimerasa II para activar la transcripción en respuesta a TGF β (5, 10, 19).

Las Smads también interaccionan directamente con proteínas para regular negativamente la transcripción en respuesta a TGF β . Existen dos mecanismos generales comunes y no excluyentes para la regulación negativa de la transcripción dependiente de TGF β . Un primer mecanismo se basa en la unión de correpresores a las Smads y el reclutamiento de HDAC a los promotores diana. El segundo mecanismo se basa en el desensamblado de los activadores de Smads o de los complejos coactivadores, siendo un mecanismo independiente de HDAC (63). Las HDAC eliminan el grupo acetilo de las colas de histonas permitiendo fuertes interacciones iónicas entre las histonas y el DNA, resultando en un entorno de cromatina más restrictivo que impide la transcripción. Las HDAC son reclutadas al complejo represor por proteínas correpresoras o directamente por las Smads (63). Smad3, por ejemplo, está involucrada en la inhibición de la diferenciación de osteoblastos a través de la inhibición de la actividad del factor de transcripción Runx2. Esta inhibición ocurre a través del reclutamiento de HDAC 4 y 5 por Smad3 al complejo Smad3/Runx2 en la secuencia de unión al DNA de Runx2 (63, 75). Otros correpresores como c-Ski y SnoN interaccionan con el dominio MH2 de Smad2 y Smad3 y reprimen la activación transcripcional dependiente de las Smads (63). Esta inhibición la realizan a través del desensamblado del complejo R-Smad/Smad4, el secuestro de las R-Smads en el citoplasma, el bloqueo la interacción de las R-Smads con coactivadores transcripcionales como p300 y el reclutamiento de los correpresores N-CoR-mSin3 y HDAC al complejo de transcripción (63). La expresión de SnoN y Ski es rápidamente

inducida por TGF β , por lo que todos estos eventos pueden generar un bucle de retroalimentación negativa para limitar la duración de la respuesta dependiente de las Smads (10). Evi-1, un factor de transcripción en dedos de Zn, también reprime la señalización mediada por las Smads. Evi-1 interacciona con el dominio MH2 de Smad2 y Smad3 y recluta al correpresor E1A carboxy-terminal binding protein (CtBP) y a HDAC a promotores de genes diana de TGF β (53, 63). Otro factor de transcripción, TGIF, reprime la señalización dependiente de las Smads no solo reclutando a los correpresores mSin3, CtBP y HDAC al complejo de transcripción si no también compitiendo con CBP o p300 por la interacción con las R-Smads (5, 63). Por otro lado, TIF1 γ inhibe la señalización de TGF β mediante la ubiquitinación de Smad4 y el consecuente desensamblado del complejo de las Smads (76). Finalmente, las Smads también pueden inhibir la expresión de genes impidiendo la acción de coactivadores transcripcionales. El efecto inhibitorio de TGF β sobre la diferenciación muscular es debido a la interferencia de Smad3 con el factor de transcripción MyoD y por otro lado también de MEF-2, impidiendo la actuación de ambos factores de transcripción sobre la activación de genes críticos para la diferenciación miogénica (10).

I.5. TGF β y cáncer.

La alteración de la señalización de TGF β está relacionada con numerosas enfermedades entre las que se encuentra el cáncer. TGF β tiene un complejo papel en esta enfermedad; inicialmente actúa como un supresor tumoral inhibiendo la proliferación celular e induciendo apoptosis, pero en estadios avanzados de la progresión tumoral, TGF β promueve la tumorigénesis mediante la inducción de la transición epitelio mesénquima (EMT), la estimulación de la angiogénesis y la supresión del sistema inmune (8) (Figura 9).

Se han encontrado inhibiciones de la expresión, deleciones o mutaciones de los componentes de la señalización de TGF β que actúan positivamente en la cascada de señalización en tumores de origen diverso, entre los que cabe mencionar colon, páncreas, mama, pulmón y próstata (7). Por ejemplo, mutaciones del T β RI han sido

observadas en tumores de ovario, mama, páncreas y linfoma de células T, mientras que las mutaciones del TβRII son muy frecuentes tanto en cáncer de colon hereditario como esporádico (77). Por otro lado, se ha encontrado que la señalización de Smad2 y Smad3 media tanto señales supresoras tumorales como metastásicas dependiendo del contexto celular; la expresión reducida de Smad2 en tumores de mama aumenta la tumorigenicidad, mientras que en carcinomas más agresivos provoca una reducción de la metástasis (7). También hay una elevada frecuencia de pérdida de expresión de Smad3 en tumores. La expresión de Smad3 está perdida en 3 de cada 8 cánceres gástricos y también 2 de cada 9 líneas celulares gástricas han perdido parte de la

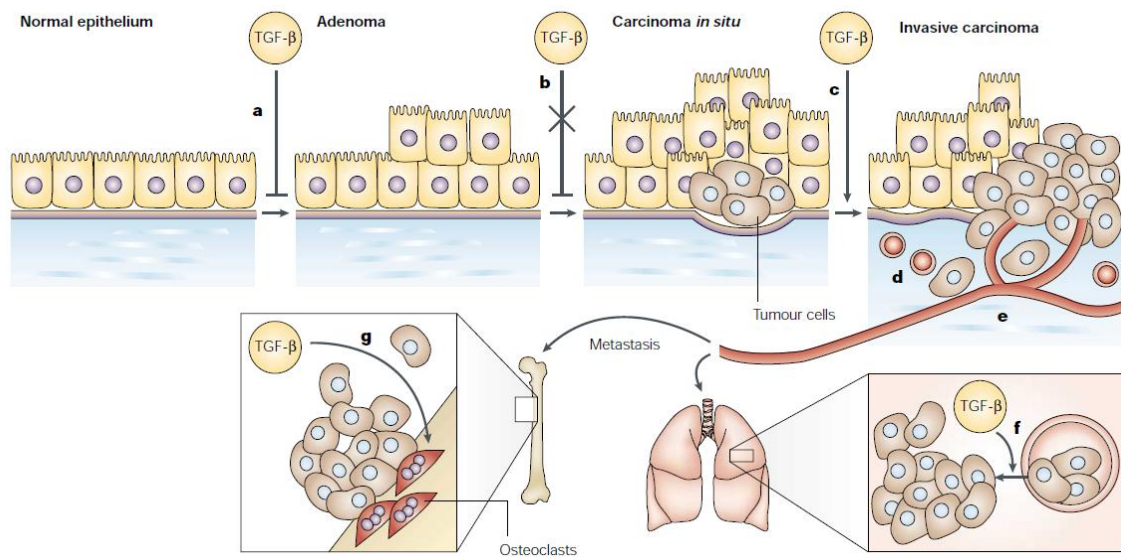


Figura 9. Papel de TGFβ en cáncer. TGFβ desempeña diferentes papeles durante la progresión tumoral dependiendo del estadio del tumor. A. TGFβ limita el crecimiento del epitelio normal y de tumores en estadios tempranos. B. La pérdida de la parada del crecimiento por TGFβ debido a la pérdida de receptores de TGFβ, proteínas Smads o por la pérdida específica de genes de respuesta citostática, selecciona tumores de crecimiento más agresivo facilitando la adquisición de mutaciones adicionales. C. Las células tumorales que han perdido la respuesta citostática pero retienen los componentes de la señalización de TGFβ pueden llevar a cabo una transición epitelio mesénquima en respuesta a TGFβ, resultando en células más invasivas. D. El TGFβ secretado por el tumor crea un ambiente inmunosupresivo a través de la inhibición de la función de células T, permitiendo a las células tumorales escapar. E. TGFβ puede inducir una respuesta angiogénica, facilitando el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos que apoyan el crecimiento del tumor y la diseminación sistémica. F. Las adherencias de células tumorales al epitelio y/o la extravasación a diferentes sitios de metástasis puede ser aumentada por la señalización de TGFβ. G. TGFβ estimula la expresión de genes como *IL11* y *CTGF* que promueven la metástasis de hueso por las células de cáncer de mama. Figura tomada de Siegel *et al* (77).

respuesta a TGF β (7). Smad4 es otro componente de la vía de señalización de TGF β frecuentemente alterado en cáncer. La pérdida de heterocigosidad del cromosoma 18q, cromosoma donde está localizado el gen de Smad4, se da en el 30% de los tumores de mama, próstata, neuroblastoma y cáncer cervical, 60% de cáncer de colon, 61% de cáncer gástrico y hasta un 90% de cáncer pancreático (7). Por otro lado, Smad4 también juega un papel en metástasis; la eliminación de Smad4 en células de cáncer de mama MDA-MB-231 inhibe la frecuencia de metástasis de hueso en ratones desnudos hasta un 75% y aumenta significativamente la supervivencia libre de metástasis. Todo esto sugiere que Smad4 está implicada tanto en la supresión tumoral como en la progresión del cáncer dependiendo del estadio y el tipo de tumor (7). Se han encontrado también amplificaciones de los inhibidores de la vía de señalización de TGF β , por ejemplo, Smad7. La retención y amplificación de Smad7 es un evento que es seleccionado positivamente en la progresión de tumores colorrectales y su sobreexpresión es frecuentemente observada en carcinomas tiroideo foliculares y de endometrio. Además, Smad7 juega un papel en la progresión del cáncer a través de la modulación de la invasión celular y metástasis; su sobreexpresión, por ejemplo, en células de carcinoma mamario de ratón, inhibe la metástasis (7).

En muchos tipos de tumores se produce la inactivación de la función supresora de la señalización de las Smads por diversas señales oncogénicas. Muchas oncoproteínas interactúan directamente con las Smads o las modifican post-transcripcionalmente interfiriendo con su función (8). Por ejemplo, la señalización de la Erk MAP quinasa desestabiliza Smad3 resultando en una pérdida significativa de la inhibición del crecimiento dependiente de TGF β . Por otro lado, el factor ZEB1 que se une a Smad2/Smad3 y aumenta su actividad transcripcional, está reprimido en los linfomas de células T (8), mientras que la expresión de Smad7 está aumentada, dando una doble señal que inactiva la señalización de las Smads durante la progresión del tumor (8). Mientras que la inactivación o el debilitamiento de la señalización de TGF β por señales oncogénicas explica la sobreproliferación de células cancerosas en estadios tempranos de la tumorigénesis, mecanismos similares aumentan la invasión celular y la progresión en carcinomas más avanzados (8). Por ejemplo, la activación de la vía NFAT lleva al desplazamiento de Smad3 del promotor de c-Myc por NFAT, lo que

activa la expresión de c-Myc contribuyendo a la sobreproliferación de las células tumorales, mientras que la señalización TGFβ/Smad3 es libre de mediar funciones protumorigénicas adicionales (8). Además, diferentes condiciones del ambiente tumoral pueden inducir regulaciones diferentes de Smad2 y Smad3 que puedan proveer la señal para el cambio en el papel de TGFβ en la progresión del cáncer. Por ejemplo, bajo condiciones de hipoxia, frecuentes durante la progresión tumoral, la fosfatasa PP2A desfosforila preferentemente a Smad3, inactivándola, mientras que la fosforilación y funciones de Smad2 quedan intactas. Por este mecanismo, la respuesta antiproliferativa queda comprometida por la función subóptima de Smad3 mientras otras respuestas TGFβ/Smad permanecen intactas (8).

La perturbación de la señalización de TGFβ juega un papel muy importante en la progresión tumoral. La vía de señalización de TGFβ, por consiguiente, se ha constituido como una diana atractiva para la búsqueda de diferentes aproximaciones terapéuticas que palien dicha enfermedad. Entre ellas, varias estrategias inmunoterapéuticas están basadas en el hecho de que una de las contribuciones de TGFβ para la progresión del tumor es la evasión de la respuesta inmune (3). El desarrollo de nuevas estrategias también se basa en el uso de pequeñas moléculas inhibitorias de los receptores de TGFβ como A-80-01, LY364947, LY550410, LY580276, LY566578, SB-505124, SD-093, SD-208 y SB-431542 ó el uso de proteínas solubles específicas de TGFβ como Fc-TβRII. También en el uso de anticuerpos neutralizantes como 1D11, metelimumab/CAT-192 y 2G7, y compuestos antisentido específicos para componentes de la señalización de TGFβ como los compuestos AP12009 y AP11014 que inhiben a TGFβ2 y TGFβ1, respectivamente. Finalmente, otras estrategias también se basan en el uso de aptámeros: secuencias oligonucleotídicas que reconocen cualquier molécula diana con alta especificidad y afinidad, y se usan para interferir en las interacciones proteína-proteína (3, 7). Sin embargo, todavía es necesario un mejor entendimiento de los fenómenos que llevan a TGFβ de ser un supresor a ser un promotor tumoral para el desarrollo de estrategias terapéuticas adecuadas.

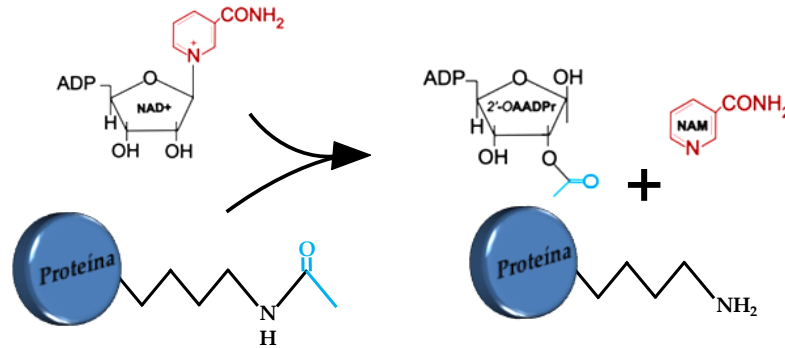
I.6. Desacetilasas de Histonas (HDAC). Familia de las Sirtuinas.

Las HDAC son enzimas con actividad desacetilasa de histonas implicadas en la modificación del núcleo de histonas y que por lo tanto, participan en complejos reguladores que pueden activar o suprimir la transcripción (47). Las HDAC se clasifican en 4 grupos atendiendo al criterio de similitud de secuencia (46, 47). La clase I está compuesta por las HDAC 1, 2, 3 y 8. Todas ellas de longitud aproximada de 400-500 aminoácidos que comparten un alto grado de homología con el gen de levaduras *RPD3*. Generalmente se localizan en el núcleo, están expresados de manera ubicua en muchos tejidos humanos y son sensibles a TSA (46). La clase II está compuesta por las HDAC 4, 5, 6, 7, 9 y 10. De aproximadamente 1000 aminoácidos de longitud, todas ellas son homólogos al gen de levaduras *Hda*. Son citoplasmáticas y están diferencialmente expresadas en tejidos humanos con mayores niveles en corazón, cerebro y músculo esquelético. También éstas son sensibles a TSA (46). La clase III está compuesta por las llamadas Sirtuinas (Sir o Silent Information Regulator proteins). De aproximadamente 300-400 aminoácidos de longitud, excepto Sirt1 que tiene 747 aminoácidos, todas ellas son homólogos al gen de levadura *Sir2* y su actividad desacetilasa es dependiente del cofactor NAD^+ . Su localización celular es variable entre los distintos miembros y no son sensibles a TSA (46). Por último, la clase IV está compuesta por proteínas similares a HDAC 11. De aproximadamente 400-500 aminoácidos de longitud, generalmente se localizan en el núcleo, están diferencialmente expresadas en los tejidos humanos con mayores niveles en corazón, cerebro, músculo esquelético y riñón, y son sensibles a TSA (46, 47).

Los miembros de la familia de desacetilasas de clase III, las Sirtuinas, son una familia de desacetilasas de histonas y ADP-ribosilas dependientes de NAD^+ (Figura 10). Los residuos ϵ -acetil-lisina de las proteínas son sustrato de la desacetilación de las Sirtuinas, las cuales generan, por la hidrólisis del NAD^+ , una molécula de nicotinamida y un metabolito único de acetil-ADP-ribosa llamado 2'-OAADPr (2'-O-acetil-ADP-ribosa) (78, 79) (Figura 10). La actividad desacetilasa de las Sirtuinas está controlada por el ratio $[\text{NAD}^+]/[\text{NADH}]$ y los niveles de nicotinamida y 2'-OAADPr, los cuales dependen de la energía celular, por lo que las Sirtuinas pueden

ser un sensor de energía extremadamente versátil que permite detectar el estado metabólico de la célula (79). Por otro lado, la ADP-ribosilación de los sustratos implica la formación de un enlace N- ó S-glicosídico entre el aminoácido específico (arginina o cisteína) de la proteína aceptora y el residuo ADP-ribose del NAD⁺ (79) (Figura 10).

A. DESACETILACIÓN



B. POLI-ADP-RIBOSILACIÓN

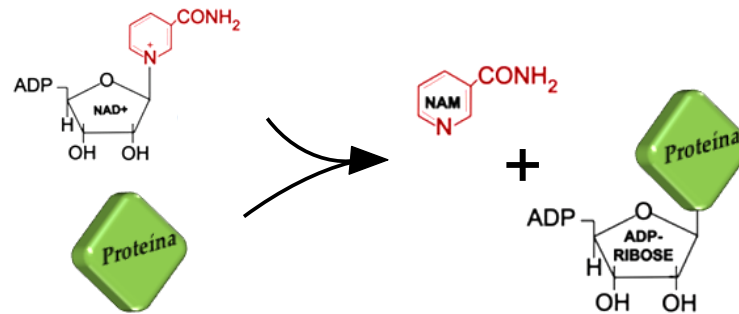


Figura 10. Actividad de las Sirtuinas. Las Sirtuinas poseen actividad desacetilasa y ADP-ribosil transferasa. Se detallan los mecanismos de desacetilación y ADP-ribosilación llevados a cabo por las Sirtuinas. A. Mecanismo de la desacetilación de proteínas realizada por las Sirtuinas. B. Mecanismo de la ADP-ribosilación de proteínas realizada por las Sirtuinas. NAM: Nicotinamida. 2'-OAADPr: 2'-O-acetyl-ADP-ribose.

Los miembros de esta familia están evolutivamente conservados desde bacterias a mamíferos y han sido implicados en silenciamiento génico, progresión de ciclo celular, estabilidad cromosómica, metabolismo celular y envejecimiento (80-82). El primer miembro de la familia fue descrito en *Saccharomyces cerevisiae* y se denominó silent information regulator 2 (Sir2). Éste fue originalmente identificado como un factor transactivador involucrado en la represión transcripcional del locus “silent mating type” en levaduras (83). Estudios pioneros demostraron que las Sirtuinas desempeñaban un importante papel en el silenciamiento transcripcional, a la vez que

contribuían a la regulación de la longevidad de levaduras y otros pequeños organismos por restricción calórica (84). Primeramente, se le atribuyó una actividad ADP-ribosil transferasa, pero finalmente se determinó que la desacetilación es el mecanismo por el cual Sir2 regula estos procesos *in vivo* (78). En levaduras existen cuatro genes adicionales con alta homología a Sir2, homologues of Sir2 1 a 4 (HST 1 a 4) (80).

En mamíferos se conocen siete homólogos de la proteína Sir2 de levaduras, Sirt 1 a 7. Las Sirtuinas de mamíferos tienen un papel regulador en la regulación de longevidad por restricción calórica y envejecimiento (85). Han sido implicadas en numerosos procesos fisiológicos y celulares como son la modificación de la estructura cromosómica y transcripción, apoptosis, supervivencia y senescencia celular, proliferación celular, control del ciclo celular, respuesta al estrés celular, reparación del DNA, biogénesis de ribosomas, replicación de VIH-1, regulación de canales iónicos, la regulación del metabolismo energético, desarrollo, diferenciación, mantenimiento de la integridad genómica y, además, han sido implicadas en enfermedades metabólicas, cardiovasculares, neurodegenerativas, inflamatorias y cáncer, entre otras (78, 79, 86). Las Sirtuinas tienen un dominio catalítico central dependiente de NAD⁺ altamente

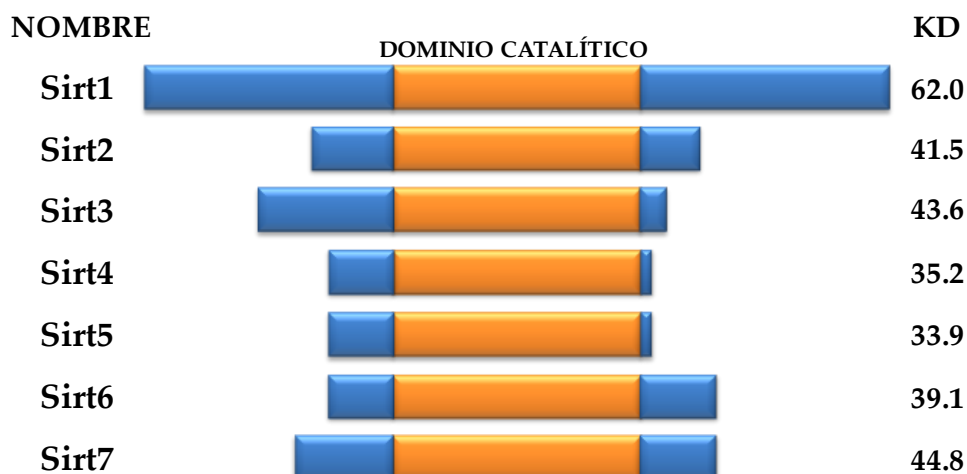


Figura 11. Sirtuinas de mamíferos. Las Sirtuinas presentan un dominio catalítico central conservado y dos dominios únicos N-terminal y C-terminal de longitud variable. Se representan los diferentes dominios de las siete Sirtuinas de mamíferos. En naranja se representa el dominio catalítico central y en azul los dominios amino y carboxilo terminal. Se detalla el nombre de la proteína, la posición del dominio catalítico y el tamaño de las proteínas en KiloDalton (KD).

conservado de 275 aminoácidos primeramente identificado en la proteína Sir2. Además, tienen un dominio único N-terminal y C-terminal de longitud variable (78, 81) (Figura 11). Los diferentes miembros de esta familia se caracterizan por su localización subcelular, especificidad de sustrato y función variables (Tabla 1). Mientras que Sirt1, 6 y 7 son predominantemente nucleares, Sirt2 es citoplasmática y Sirt3, 4 y 5 están localizadas en mitocondrias. Sirt3 puede ser también una proteína nuclear que en situaciones de estrés celular se transloca a la mitocondria (87-89) (Tabla 1). Las siete Sirtuinas de mamíferos son en principio clasificadas como desacetilasas dependientes de NAD⁺. Sirt1, 2, 3 y 5 poseen actividad desacetilasa. La actividad ADP-ribosil transferasa de las Sirtuinas, aunque en un principio era considerada como una reacción secundaria de baja eficiencia, ha sido demostrado como actividad principal en Sirt4 y 6. De hecho, poco o nada de actividad desacetilasa ha sido encontrada en la forma purificada de dichas enzimas (78, 90). También ha sido detectada la actividad ADP-ribosil transferasa para Sirt2 y 3 (78). Finalmente, hasta ahora no se ha detectado ni actividad desacetilasa ni ADP-ribosil transferasa para Sirt7 (91) (Tabla 1). Un análisis filogenético de 60 dominios centrales de Sirtuinas de diferentes organismos eucariotas y procariotas dividen a las Sirtuinas en 4 clases: Clase I, II, III y IV. Sirt1, 2 y 3 pertenecen a la clase I, Sirt4 a la clase II, Sirt5 a la clase III y finalmente Sirt6 y 7 a la clase IV (Tabla 1). La clase II y III parecen haber evolucionado más temprano que otras clases, por lo que Sirt4 y 5 podrían ser las Sirtuinas más antiguas (78, 81).

SIRTUINA	CLASE	LOCALIZACIÓN	ACTIVIDAD	SUSTRATO
Sirt1	I	Núcleo	Desacetilasa	H3K9, H4K16, p53 etc
Sirt2	I	Citosol	Desacetilasa y ADP-ribosil transferasa	H4K16, H3K56, α tubulina
Sirt3	I	Mitocondria y núcleo	Desacetilasa y ADP-ribosil transferasa	H4K16, H3K56, Ku70, IDH2 etc
Sirt4	II	Mitocondria	ADP-ribosil transferasa	Glutamato deshidrogenasa
Sirt5	III	Mitocondria	Desacetilasa	Citocromo C
Sirt6	IV	Núcleo	ADP-ribosil transferasa	H3K9, H3K56
Sirt7	IV	Núcleo	Desconocida	RNA Pol I, p53

Tabla 1. Diferentes características de las Sirtuinas de mamíferos. Las Sirtuinas exhiben características diferentes que las implican en funciones celulares distintas. Se detalla el nombre, clase a la que pertenecen, localización subcelular, tipo de actividad enzimática y ejemplos de sustratos de cada una de ellas.

I.7. Sirt1: función, sustratos y localización.

De los miembros de la familia de las Sirtuinas, Sirt1 ha sido el más estudiado. Sirt1 es el homólogo más cercano al gen *Sir2* de levaduras y únicamente presenta actividad desacetilasa (90, 92).

Al igual que las Sirtuinas de levaduras y otros pequeños organismos, Sirt1 desempeña un papel regulador en longevidad por restricción calórica y en envejecimiento (85). Existen diversas evidencias directas al respecto. En roedores, bajo restricción calórica, los niveles de expresión de Sirt1 aumentan en algunos tejidos: cerebro, riñón, hígado, tejido adiposo blanco y músculo esquelético (86, 89, 93). También, ratones transgénicos que sobreexpresan Sirt1 muestran diversos beneficios metabólicos que coinciden con fenotipos producidos por la restricción calórica, por ejemplo, menor peso, reducción de la masa grasa, homeostasis mejorada de la glucosa, niveles reducidos de colesterol, alta tasa metabólica, alta consumición de oxígeno, habilidad física mejorada y reproducción retrasada (86, 94, 95). Ratones tratados con compuestos activadores de Sirt1 como resveratrol o SRT1720 desarrollan fenotipos similares a los producidos por la sobreexpresión de Sirt1 (89, 95). Por otro lado, otros estudios muestran que ratones mutantes para Sirt1 tienen un periodo de vida más corto (89, 96) y atenúan el incremento de actividad física producida por la restricción calórica (89, 97). Además de estas evidencias directas, Sirt1 regula una gran variedad de procesos fisiológicos conocidos por ser afectados durante el envejecimiento y que son alterados por la restricción calórica (78, 85). Entre ellos se encuentran la inflamación, regulación del metabolismo celular, daño al DNA, mantenimiento de telómeros, apoptosis, resistencia al estrés oxidativo, senescencia, ciclo celular, la modificación de la estructura de la cromatina y transcripción, tumorigénesis, diferenciación, desarrollo y protección neuronal (78, 79, 85, 86, 90, 98).

Debido a la diversidad de funciones que desempeña, Sirt1 ha sido implicada en una gran variedad de enfermedades humanas. Entre ellas, cabe destacar diversos síndromes metabólicos como la diabetes tipo 2, enfermedades mitocondriales, obesidad y homeostasis de lípidos desregulada. Esto se entiende ya que Sirt1 juega un papel muy importante como regulador de diferentes vías metabólicas como la

modulación de la biogénesis mitocondrial, modulación de la tasa metabólica, sensibilidad a la insulina y el metabolismo de la glucosa y los lípidos (86, 89). Sirt1 actúa como neuroprotector y ha sido implicada en enfermedades neurodegenerativas: Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, degeneración Walleriana y neuritis óptica (86, 89, 90, 99). También Sirt1 ha sido implicada en enfermedades relacionadas con el sistema inmune e inflamación y enfermedades cardiovasculares (86, 89, 90). Sirt1 actúa como cardioprotector debido a su implicación en metabolismo del colesterol, la regulación de eNOS, reducción de la senescencia de células del músculo liso, supresión de la inflamación y especies reactivas de oxígeno (ROS) en arterias y el aumento del crecimiento vascular (89). Por último, Sirt1 está implicada en cáncer. Aunque el papel que juega en la tumorigénesis no se ha determinado claramente, Sirt1 actúa en algunos casos como supresor tumoral y en otros casos como promotor tumoral (se comentará más adelante en esta introducción, apartado I.10) (89, 90, 100, 101).

La implicación de Sirt1 en todos estos procesos se entiende por su capacidad de desacetilación de proteínas histónicas y no histónicas. Sirt1 está implicada en la desacetilación de los residuos de lisina de las siguientes histonas: H1K26, H3K9, H3K14 y H4K16 (102, 103). También parece desacetilar el residuo de lisina 56 de la histona H3 (H3K56) en el promotor de Bclaf1 lo cual provoca una inhibición de la activación de células T (104). Por otro lado, Sirt1 está implicada en la desacetilación de una gran variedad de proteínas no histónicas entre las que se encuentran supresores tumorales, factores de transcripción, proteínas de señalización, enzimas y receptores nucleares de hormonas. El primer sustrato no histónico identificado para Sirt1 fue la proteína p53, un supresor tumoral involucrado en apoptosis en respuesta a daño al DNA y estrés oxidativo. La proteína p53 en su estado hiperacetilado queda estabilizada y activada para la inducción de apoptosis y parada del ciclo celular. Sirt1, mediante la desacetilación de p53, permite la ubiquitinación de p53 por MDM2, lo que induce su degradación y favorece la supervivencia celular. De hecho, la sobreexpresión de Sirt1 inhibe la actividad transcripcional de p53 y la apoptosis dependiente de p53 en respuesta al daño al DNA y el estrés oxidativo, mientras que la sobreexpresión de un mutante dominante negativo de Sirt1 potencia dichas respuestas (79, 105, 106). Aparte

de esta proteína, se han descrito numerosos sustratos no histónicos de Sirt1, entre ellos se encuentran p73 (supresor tumoral involucrado en ciclo celular y apoptosis), FOXO1, FOXO3a y FOXO4 (factores de transcripción Forkhead), E2F1 (factor de transcripción importante en ciclo celular), PTEN (supresor tumoral que regula la señalización PI3K/Akt), MEF2 (factor de transcripción importante en diferenciación celular), HIF-1 α , HIF-2 α (factores de transcripción inducibles por hipoxia), TAF(I)68 (subunidad proteica implicada en la transcripción por la RNA Pol I), β -catenina (componente de la señalización de WNT), RelA/p65 (componente de la señalización NF- κ B, implicado en función inmune), Ku70 y NBS1 (proteínas de reparación de DNA), XPA (proteína de reparación escisión de nucleótidos), Smad7 (proteína inhibidora de la señalización de TGF β), APE1 (proteína implicada en la vía de reparación base-escisión), PCAF y p300 (acetiltransferasas de histonas), SUV39H1 (metiltransferasa de histonas) y PPAR γ , ER α ,61 AR,62 y LXR63 (receptores de hormona nuclear) (90).

Típicamente, Sirt1 presenta una localización subcelular nuclear (87), sin embargo, su localización puede variar en diferentes tejidos (26) y también durante el desarrollo embrionario y la diferenciación celular (26). Así, en colon humano no transformado su distribución es mayoritariamente citosólica, y en líneas tumorales humanas procedentes de colon presenta una distribución citosólica aún más acusada (107). La localización de Sirt1 también puede variar en respuesta a estímulos fisiológicos y patológicos. Por ejemplo, la inhibición de la ruta PI3K-Akt induce la localización citosólica de Sirt1, sin embargo, la estimulación con insulín-like growth factor-1 (IGF1), una señal aguas arriba de la señalización de PI3K, atenúa la exclusión nuclear provocada por la inhibición de la señalización de PI3K en células C2C12, línea celular de mioblastos humanos (26). Sirt1 es transportada desde el núcleo al citoplasma por el transportador CRM1 y su localización es regulada por dos secuencias funcionales tipo NES y otras dos tipo NLS presentes en la proteína (26). De igual manera, la proteína de levaduras Sir2 contiene dos posibles NLS y NES que son muy similares a las secuencias presentes en ratón, sugiriendo que el mecanismo de transporte entre núcleo y citosol de las Sirtuinas es importante y está conservado desde levaduras a vertebrados (26). Finalmente, el transporte nucleocitoplasmático de Sirt1 parece ser un mecanismo regulador de la función de Sirt1 (26).

I.8. Regulación de la actividad y expresión de Sirt1.

Sirt1 es una proteína implicada en una gran diversidad de funciones celulares. Por lo tanto, su expresión y actividad están sujetas a regulación durante el proceso de transcripción y traducción. También las modificaciones post-traduccionales y proteínas moduladoras contribuyen a regular su actividad. Finalmente, los cambios energéticos de la célula también influyen en su actividad.

Sirt1 está regulada transcripcionalmente por numerosos factores de transcripción, entre los que se encuentran E2F1, cMyc, p53, hypermethylated in cancer 1 (HIC1), y CtBP (Figura 12). E2F1 y Myc son dos factores de transcripción que se unen al promotor de Sirt1 e inducen su expresión (92, 100, 108) (Figura 12). E2F1 induce la expresión de Sirt1 en respuesta al daño al DNA (92). Sirt1, a su vez, desacetila a E2F1 inhibiendo la transcripción mediada por dicho factor de transcripción (92, 100, 108) y también desacetila a c-Myc promoviendo su degradación (100), cerrando así un bucle de retroalimentación negativa. Por otro lado, p53, HIC1, y CtBP regulan la expresión de Sirt1 de manera negativa. En condiciones óptimas de nutrientes, la cooperación entre p53 y la proteína represora reguladora HIC1 media la represión de la expresión de Sirt1 (Figura 12). A su vez, Sirt1 desacetila p53 inhibiéndola (92, 100). Por último, CtBP se dimeriza con el represor HIC1 inhibiendo la transcripción de Sirt1 (Figura 12). La inhibición de la expresión de Sirt1 por CtBP depende de los niveles de NADH celulares. Sirt1 por su parte desacetila a HIC1 inhibiéndola (92, 100).

Los niveles de Sirt1 también son regulados post-transcripcionalmente a través del control de la estabilidad de su mRNA y de modificaciones post-traduccionales. HuR, proteína de unión a mRNA, se asocia al extremo 3' UTR del mRNA de Sirt1 aumentando su estabilidad, lo que lleva asociado un aumento de la concentración de la proteína de Sirt1. Bajo estrés oxidativo, HuR es fosforilado por Chk2 lo que provoca la disociación de HuR del mRNA de Sirt1 resultando en una desestabilización del mRNA de Sirt1 y la consiguiente reducción de la concentración de la proteína Sirt1 (92, 100, 108) (Figura 12). La actividad enzimática de Sirt1 también es regulada por modificaciones post-traduccionales. La pérdida general de la fosforilación de Sirt1 lleva a una disminución de su actividad desacetilasa (109) (Figura 12). Mediante

espectrometría de masas se han descrito hasta 13 residuos en Sirt1 que son fosforilables *in vivo*. Todos los sitios identificados de fosforilación están localizados en los dominios C-terminal y N-terminal pero ninguno ha sido hallado en el dominio central (109). Dichos sitios de fosforilación son dianas potenciales de quinasas como ATM, CDK5, CK1, CK2, DNAPK, ERK1, GSK3, IKK, CDK1 y MAPK. De este modo, un gran número de vías de señalización podrían influir en la función de Sirt1 a través de la actividad de quinasas y fosfatasa (109). Entre éstas, el complejo CiclinaB/Cdk1 interacciona con Sirt1 *in vivo* fosforilando los residuos de treonina 530 y serina 540 de Sirt1 (100, 109). Otras quinasas descritas para Sirt1 son: CK2 (110), JNK2 cuya fosforilación regula la estabilidad de Sirt1 (111) y JNK1 que promueve su localización nuclear y actividad (112). La actividad de Sirt1 también está regulada por sumoilación. En ausencia de daño al DNA, Sirt1 es sumoilada en el residuo de lisina 734 lo que activa su función desacetilasa (Figura 12). Sin embargo, la exposición a rayos UV o peróxido de hidrógeno induce la desumoilación de Sirt1 inactivando su función desacetilasa, lo que promueve apoptosis (92, 100, 108).

Se han descrito proteínas reguladoras de la actividad catalítica positivas y negativas de Sirt1. Entre los reguladores positivos se encuentra la proteína active regulator of Sirt1 (AROS) que interacciona con Sirt1 y activa su función desacetilasa (Figura 12). AROS incrementa la desacetilación de p53 mediada por Sirt1 y por tanto regula la apoptosis (113). Entre los reguladores negativos encontramos a la proteína deleted in breast cancer-1 (DBC1), que interacciona directamente con Sirt1 e inhibe su actividad *in vitro* e *in vivo* (Figura 12). DBC1 inhibe la desacetilación de p53 por Sirt1 promoviendo la apoptosis (114, 115). El balance entre AROS y DBC1 determina que las células sufran o no apoptosis inducida por estrés (92, 100). Otro regulador negativo de Sirt1 es la proteína Tat, proteína del virus VIH (Figura 12). Tat se une a Sirt1 y bloquea la habilidad de Sirt1 de desacetilar la subunidad p65 de NF- κ B, lo que causa la hiperactivación de NF- κ B en células T infectadas. Esta hiperactivación provoca la producción sin restricción de citoquinas inmuno-activadoras y pro-inflamatorias en células T infectadas con el virus VIH (92).

Finalmente, la actividad de Sirt1 también está controlada por el balance entre NAD⁺/NADH. La privación de glucosa y los cambios metabólicos asociados a la restricción calórica alteran la relación NAD⁺/NADH, influyendo en la activación de Sirt1. NADH, nicotinamida y 2'-OAADPr, estos dos últimos metabolitos generados en la desacetilación de proteínas por Sirt1, inhiben su actividad (79) (Figura 12). Por otro lado, Sirt1 al consumir NAD⁺ con su actividad enzimática, altera la relación NAD⁺/NADH modificando el estado redox de la célula. De esta manera Sirt1 sirve como un sensor celular de la disminución de la concentración de glucosa y disponibilidad de NAD⁺ (100).

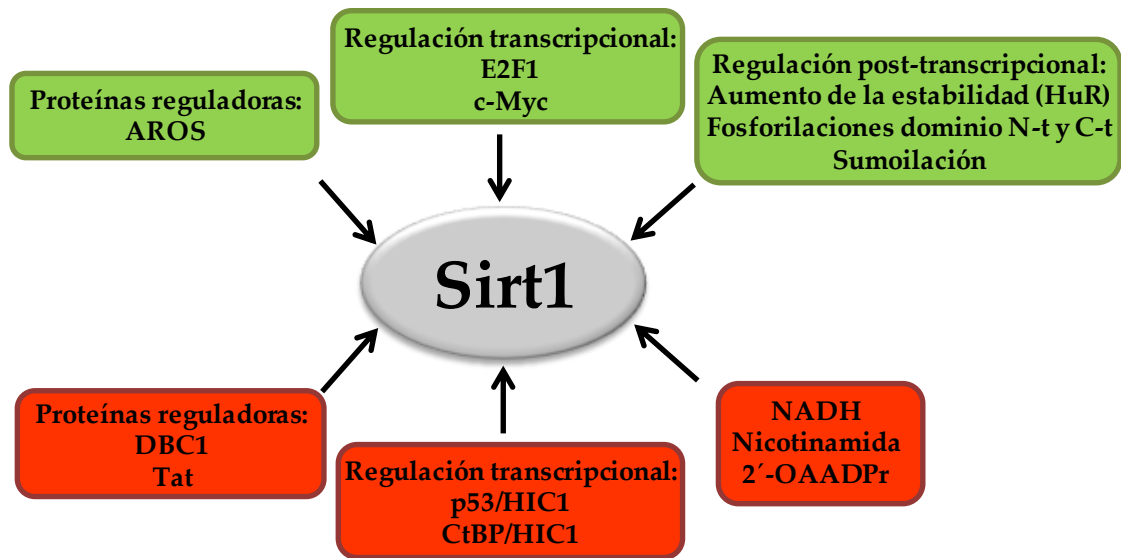


Figura 12. Regulación de la actividad/expresión de Sirt1. La actividad y expresión de Sirt1 están reguladas durante el proceso de transcripción y traducción, por modificaciones post-traduccionales, por proteínas reguladoras y por cambios energéticos de la célula. Se detallan los diferentes mecanismos de regulación de la actividad/expresión de Sirt1. Se indica en color verde o rojo si el efecto de regulación es positivo o negativo, respectivamente, sobre la actividad/expresión de Sirt1.

I.9. Silenciamiento de la cromatina y represión de la transcripción mediada por Sirt1.

Análisis citogenéticos de la cromatina identifican dos tipos de cromatina que son estructural y funcionalmente diferentes; eucromatina y heterocromatina. La

euromatina es la cromatina menos compacta, contiene una mayor concentración de genes y a menudo se encuentran en transcripción activa. Por otro lado, la heterocromatina es la cromatina altamente condensada durante la división celular (46). Existen dos tipos de heterocromatina: constitutiva y facultativa. La heterocromatina constitutiva consta de elementos genéticos repetitivos como los telómeros y centrómeros, mientras que la heterocromatina facultativa es el resultado de regiones génicas que están silenciadas por diferentes mecanismos pero que pueden, bajo determinados estímulos, perder su estructura condensada y volverse transcripcionalmente activas (116). La extensión y el establecimiento de la heterocromatina de regiones específicas pueden diferir entre diferentes individuos y tejidos y está mediado por modificaciones de histonas específicas y el reclutamiento y propagación de proteínas específicas de heterocromatina y factores de remodelación de cromatina. Los factores de remodelación de cromatina juegan un papel muy importante en el establecimiento, mantenimiento y herencia epigenética de la heterocromatina (46, 117). Así, el contexto de la cromatina en el que se incluye un gen concreto puede finalmente determinar si el gen es expresado o silenciado. La heterocromatización de una región de euromatina y sus alrededores tiene un importante impacto en el estado de expresión de los genes (46). La heterocromatina está asociada con la hipoacetilación de histonas y represión de genes.

I.9.1. Influencia de la acetilación en la estructura de la cromatina: marcas de euromatina y heterocromatina.

Como hemos comentado previamente, la acetilación del núcleo de histonas está asociada a un entorno de cromatina permisivo con activación transcripcional, mientras que la desacetilación de dichas histonas está asociada a un entorno restrictivo sin transcripción (46, 71, 72). Las regiones de la cromatina transcripcionalmente activas están generalmente enriquecidas de histonas H3 y H4 altamente acetiladas (46). Diferentes modificaciones específicas en residuos de lisina han sido descritas como marcas de cromatina activa y abierta o como marcas de heterocromatina. Entre las marcas de cromatina activa, la más característica es la acetilación del residuo de lisina

16 de la histona H4 (H4K16Ac). Además de ésta se conocen otras como K3K9Ac, H3K14Ac, H3K18Ac, H3K23Ac, H3K56Ac y las metilaciones de los residuos de lisina H3K4me2 (dimetilación), H3K4me3 (trimetilación) y H3K79me2, entre otras. Entre las marcas de heterocromatina se conocen la dimetilación del residuo de lisina 9 de la histona H3 (H3K9me2), H3K9me3, H3K27me3 y H4K20me1 entre otras (71, 102, 118, 119).

I.9.2. Implicación de Sirt1 en el silenciamiento de la cromatina y represión de la transcripción.

Sirt1 es reclutada a la cromatina a través de su interacción con factores de transcripción y/o correguladores entre los que se encuentran CTIP1, CTIP2, HES1, HEY2, MyoD, PGC-1 α , FOXO, p53, BCL11A y NCoR y SMRT (71, 120). Sirt1, una vez unida a los promotores de genes diana, reprime la expresión génica a través de la modificación de la cromatina, que incluye la desacetilación y metilación de histonas y la metilación de DNA, lo que genera una cromatina represiva o heterocromatina (Figura 13). Sirt1 desacetila histonas con una clara preferencia por el residuo de lisina 16 de la histona H4 (H4K16) (102). Sirt1 también desacetila otras histonas como la histona H3 en el residuo de lisina 9 (H3K9), H3K14 y H1K26, además de reclutar la histona H1 a los promotores de los genes diana (102, 103) (Figura 13). Además, el reclutamiento de Sirt1 a los promotores induce la monometilación del residuo de lisina 20 de la histona H4 (H4K20me1) y la di y trimetilación del residuo de lisina 9 de la histona H3 (H3K9me2 y H3K9me3), tres marcas asociadas a heterocromatina o cromatina reprimida (102, 120, 121) (Figura 13). Sirt1 no tiene ningún efecto sobre la metilación del residuo de lisina 4 de la histona H3 (H3K4me), marca de cromatina abierta (102). Por último, Sirt1 también disminuye la dimetilación del residuo de lisina 79 de la histona H3 (H3K79me2), modificación asociada a cromatina activa transcripcionalmente que funciona como frontera separadora de los dominios activos e inactivos en la cromatina (Figura 13). De esta manera, Sirt1 media la formación de cromatina represiva (102, 120). Recientemente se ha descrito que Sirt1 suprime la acetilación de H3K56 mediada por p300 en el promotor de Bclaf1 inhibiendo la

activación de células T (104) (Figura 13). De acuerdo con estos datos, se ha demostrado que células MEF *Sirt1*^{-/-} contienen elevados niveles de acetilación de H3K9 y H4K16 (122). Además, embriones murinos en estadio E11 mutantes para *Sirt1* (*Sirt1*^{-/-}) contienen elevados niveles de H3K9Ac y reducidos niveles de H3K9me3 comparados con el control (122).

Sirt1 promueve la formación de H3K9me3 a través del reclutamiento directo a los promotores de supresor of variegation 3-9 homologe 1 (SUV39H1), una metiltransferasa de histonas. *Sirt1* interacciona con SUV39H1 y la desacetila en el residuo de lisina 266 situado en su dominio catalítico SET. Esta desacetilación incrementa la actividad de SUV39H1 resultando en niveles mayores de H3K9me3 (123) (Figura 13). Además, *Sirt1* forma un complejo con SUV39H1 y nucleometilina (NML) llamado eNosC, que detecta el estado de energía de la célula y controla la transcripción del rRNA. Dicho complejo se une a H3K9 en el locus rDNA desacetilándolo y dimetilándolo (H3K9me2), lo cual reprime la transcripción de rRNA y establece una cromatina silenciada en el locus rDNA protegiendo a las células de la apoptosis producida por privación de energía (121).

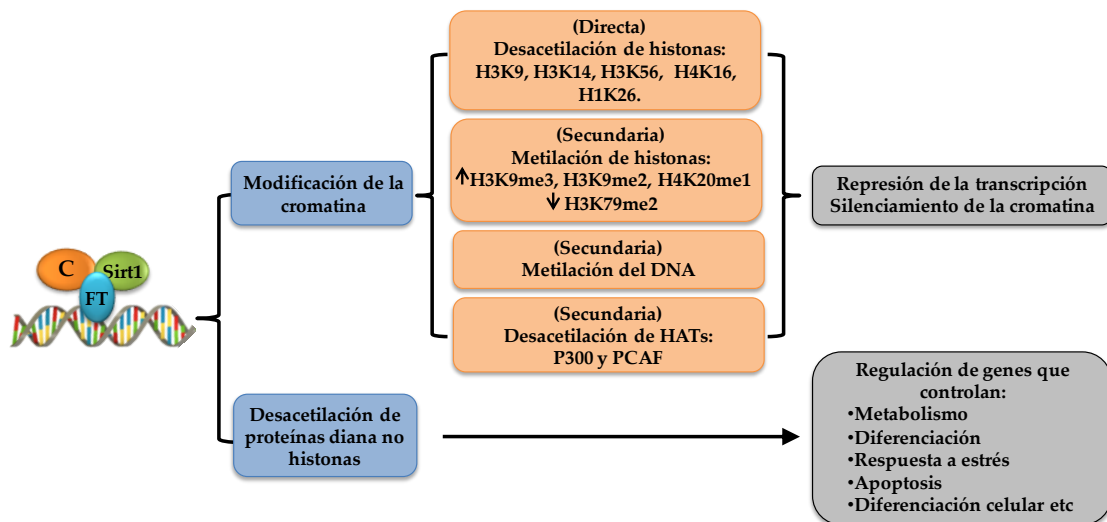


Figura 13. Mecanismos de regulación de la transcripción dependientes de *Sirt1* en mamíferos. *Sirt1* regula la transcripción a través diferentes mecanismos que modifican el estado de la cromatina y también a través de la desacetilación de proteínas no histónicas. Se detallan los diferentes mecanismos de regulación de la transcripción de *Sirt1*. FT: factor de transcripción. C: cofactor.

Sirt1 también inhibe la transcripción de determinados genes a través de la metilación del DNA en las islas CpG de los promotores de genes determinados (Figura 13). Un ejemplo es el gen *CDH1*, que codifica E-caderina, gen normalmente reprimido durante la progresión tumoral de células epiteliales y metástasis. Tras el daño al DNA, se reclutan al promotor proteínas clave para el establecimiento y mantenimiento de la represión transcripcional como Sirt1, Ezh2, DNMT1 y DNMT3B, y se observan marcas de represión como hipoacetilación de H4K16 y diferentes metilaciones de residuos de lisina de histonas: H3K9me2, H3K9me3 y H3K27me3. Esos cambios suelen ser transitorios para la mayoría de células, retornando a niveles basales una vez la reparación ha ocurrido. Sin embargo, de manera poco frecuente se puede llevar a un silenciamiento a largo plazo de dicho gen, silenciamiento heredable, donde Sirt1 tiene un papel muy importante. En dichos promotores hay un aumento de las proteínas y marcas histónicas mencionadas anteriormente, y finalmente se produce un aumento de la metilación de las islas CpG del promotor. La unión de Sirt1 al promotor es requerida para el reclutamiento de DNMT3B, una DNA metiltransferasa que metila las islas CpG del promotor del gen inhibiendo su expresión (120, 124).

Sirt1 también influye en la transcripción del DNA a través de la desacetilación de las acetiltransferasas de histonas p300 y PCAF, enzimas que están relacionadas con modificaciones de la cromatina. Sirt1 desacetila a p300 en los residuos de lisina 1020 y 1024, lo que inhibe su actividad histona acetiltransferasa (78, 125) (Figura 13). Por otro lado, las acetiltransferasas PCAF y GNC5 interactúan con Sirt1 mediando la formación de un complejo con el factor de transcripción específico de músculo MyoD. Una vez el complejo es reclutado a la cromatina, Sirt1 desacetila MyoD y PCAF y también los residuos de lisina 9 y 14 de la histona H3 en los promotores de miogenina y la cadena pesada de miosina, lo cual inhibe la expresión de genes musculares y retarda la diferenciación muscular (78, 103) (Figura 13).

I.9.3. Implicación de Sirt1 en la represión de la transcripción por mecanismos independientes a la remodelación de la cromatina.

Sirt1 también está implicada en la modulación de la transcripción, tanto positiva como negativa, a través de mecanismos diferentes a la remodelación de la estructura de la cromatina.

Sirt1 regula la expresión de genes a través de su interacción con factores de transcripción específicos y correguladores. Sirt1 desacetila una gran variedad de factores de transcripción como p53, FOXOs, NF- κ B, E2F1, HIF-1 α y MEF2D, entre otros, lo que modifica su actividad y afecta a la transcripción de sus genes diana (120) (Figura 13). Por ejemplo, Sirt1 regula a MADS box transcription enhancer factor 2 (MEF2), una familia de factores de transcripción que cooperan con MyoD en la activación de genes críticos involucrados en la diferenciación muscular. MEF2D es desacetilada por Sirt1 en el mismo residuo de lisina que es objeto de acetilación por CBP y sumoilación por HDAC 4. La desacetilación y posterior sumoilación de MEF2D inhibe su actividad transcripcional (78, 126).

Además, Sirt1 también influye en la transcripción de genes impidiendo la formación de complejos entre los factores de transcripción y sus cofactores (Figura 13). Por ejemplo, Sirt1 favorece la movilización de grasa en adipocitos blancos mediante la interferencia de la unión del receptor nuclear peroxisome proliferator-activated receptor-γ (PPAR γ) a sus cofactores NCoR y SMRT inhibiendo su actividad transcripcional (127).

Por último, Sirt1 es capaz de influir en la transcripción a través de la interacción y desacetilación de proteínas de señalización (Figura 13), influyendo en estas vías y, por tanto, modificando la transcripción dependiente de dichas vías de señalización. Un ejemplo claro es Smad7, proteína con la que Sirt1 interacciona y desacetila, provocando su ubiquitinación y posterior degradación vía proteosoma, y por tanto atenuando la apoptosis mediada por TGF β (50).

I.10. Implicación de Sirt1 en cáncer.

El papel de Sirt1 en tumorigénesis es complejo. Sirt1 ha sido asociada tanto a funciones pro-oncogénicas como funciones supresoras tumorales (89, 90, 100). Sirt1 está sobreexpresada en tumores de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma gástrico, leucemia, tumor colorrectal, de mama y de piel. Sin embargo, la expresión de Sirt1 está reducida en tumores de vejiga, carcinoma de colon, glioblastoma, tumor de ovario y próstata. Estos datos apuntan a que la función de Sirt1 en tumorigénesis está determinada por el contexto y el tipo celular (89, 90, 100).

I.10.1. Papel de Sirt1 como promotor tumoral.

Existen diversas evidencias que apoyan la idea de que Sirt1 tiene un papel protumoral. La expresión de Sirt1 está reprimida en células no tumorales por supresores tumorales como p53, Chk2, HIC1 y DBC1 (128). La sobreexpresión de oncogenes o la pérdida de función de genes de supresores tumorales en células precancerosas o tumorales, lleva a la sobreexpresión de Sirt1 o su sobreactivación, lo que resulta en una metilación y desacetilación de histonas aberrante, metilación de las islas CpG de promotores, represión de la transcripción y desacetilación e inactivación de supresores tumorales como p53, FOXO, Rb, E2F1 y Ku-70 (128). Estos cambios biológicos bloquean la senescencia, diferenciación celular, apoptosis inducida por estrés y promueven angiogénesis, crecimiento celular y resistencia a la quimioterapia. Por ejemplo, diferentes líneas celulares humanas con mayores niveles de Sirt1 tienen menores niveles de p53 acetilada lo cual provoca que, en respuesta a estrés o daño al DNA, estas células sean más resistentes a la parada en ciclo y a la apoptosis dependiente de p53. En relación con estos datos, el uso de un mutante dominante negativo de Sirt1, la inhibición de Sirt1 por sustancias químicas o su eliminación por siRNA incrementa la sensibilidad de las células al estrés (89, 101). La sobreexpresión de Sirt1 reprime la expresión o actividad de supresores tumorales y genes involucrados en la reparación del DNA como *FOXO1/2/4*, *WRN*, *Rb*, *p73*, *MLH1*, *SFRP1*, *SFRP2* y *CDH1* (89, 101). Por otro lado, la actividad/expresión de Sirt1 está sujeta a la regulación por HIC1 y DBC1, que son dos supresores tumorales. HIC1 y DBC1 están silenciados

en diferentes tumores, lo que lleva a la sobreexpresión de Sirt1 e inactivación de p53, permitiendo a las células evitar la apoptosis dependiente de p53 y por lo tanto sobrevivir ante el daño del DNA (89, 101, 129). En diferentes células cancerosas, Sirt1 está asociada a promotores de genes supresores tumorales con islas 5' CpG hipermetiladas y por tanto son genes que no se expresan. La inhibición de Sirt1 resulta en una hiperacetilación de H4K16 y H3K9 en esos promotores y la consiguiente re-expresión de dichos genes, sin alterar la hipermetilación de sus promotores (71, 130). Sirt1 también promueve el crecimiento de las células cancerosas bloqueando la senescencia celular y la diferenciación: la sobreexpresión de Sirt1 bloquea la senescencia a través de la desacetilación directa de p53, FOXO, E2F1M y/o Rb o mediante el aumento de la señalización de S6K1 (128). Además, Sirt1 es un modulador crítico de la angiogénesis y la vasodilatación: la desacetilación de FOXO por Sirt1 bloquea la senescencia endotelial, promueve el crecimiento endotelial, generación vascular, ramificación y la formación final de vasos sanguíneos (128). Sirt1 juega también un papel muy importante en el mantenimiento telomérico y la estabilidad genómica. Su sobreexpresión en células de hepatocarcinoma aumenta la proliferación celular mediante la inhibición de la senescencia celular y apoptosis. Esto es debido, en parte, a un aumento en la estabilidad genómica y al aumento, estimulado por Sirt1, de la expresión de proteínas teloméricas que protegen del acortamiento de telómeros y evitan la senescencia celular y apoptosis (131). Sin embargo, la primera evidencia clara que demuestra el papel oncogénico de Sirt1 *in vivo*, proviene de un estudio reciente donde ratones transgénicos que sobreexpresan Sirt1 eran cruzados con ratones nulos para PTEN. Dichos ratones producían carcinomas de tiroides agresivos y carcinomas de próstata (90). Recientemente, Sirt1 se ha descrito como un nuevo regulador positivo de EMT y metástasis de células de cáncer prostático (*in vitro* e *in vivo*) (132).

I.10.2. Papel de Sirt1 como supresor tumoral.

Varias son las evidencias que apoyan el papel de Sirt1 como supresor tumoral. La sobreexpresión de Sirt1 reduce la formación de cáncer de colon en ratones APC^{min/+}. *In vitro*, Sirt1 desacetila y reprime a β -catenina: en células de cáncer de colon, la

sobreexpresión de Sirt1 previene la acumulación nuclear de β -catenina y por tanto su efecto oncogénico (129). Ratones Sirt1^{+/-}; p53^{+/-} desarrollan tumores en múltiples órganos, pero la activación de Sirt1 con resveratrol reduce la tumorigénesis en estos ratones (122). En este mismo estudio, ratones deficientes en Sirt1 morían en estadios intermedios del desarrollo embrionario exhibiendo inestabilidad cromosómica y un patrón alterado de modificaciones de las histonas que causa una condensación cromosómica reducida y una menor compactación de los cromosomas en metafase. Además, estos ratones presentan una respuesta al daño al DNA perjudicada y una habilidad reducida de reparación del DNA dañado. Todo esto es coherente con la idea de que Sirt1 actúa como un supresor tumoral a través de su papel en la respuesta al daño al DNA y la integridad del genoma (122). Por otro lado, ratones p53^{+/-} que sobreexpresan Sirt1 en timocitos tras ser sometidos a irradiación, tienen un incremento en la supervivencia del 46% respecto a los animales control y la frecuencia de linfoma tímico está reducida en un 45% (89). Sirt1 desacetila diversas proteínas implicadas en reparación del DNA como APE1, NBS1, XPA y XPC, promoviendo la reparación del DNA y la supervivencia celular. De hecho, la eliminación de Sirt1 hace que las células sean más sensibles a una gran variedad de estrés genotóxicos como rayos UV, H₂O₂ etc., potencialmente debido a la hiperacetilación de estos factores de reparación del DNA (90). Se ha descrito que los tumores de mama con mutaciones en BRCA1, tienen niveles de Sirt1 reducidos. Además, la sobreexpresión de Sirt1 en células cancerosas mutantes para BCRA inhibe su proliferación *in vitro* y la generación de tumores *in vivo* cuando son implantadas en ratones desnudos (101). Por último, c-Myc, un factor oncogénico que regula la proliferación celular y apoptosis, activa la expresión de Sirt1, la cual desacetila a c-Myc promoviendo su degradación, lo que previene la transformación tumoral (89, 90, 133).

Todos estos datos muestran una estrecha relación entre Sirt1 y cáncer, y apuntan a Sirt1 como una diana terapéutica en el tratamiento de esta enfermedad.

I.11. Sistema Doble Híbrido Cyto Trap®.

El Sistema de Doble Híbrido es un método que ha demostrado una gran efectividad para detectar interacciones proteína/proteína *in vivo* (135). Además, el Sistema Doble Híbrido tiene una extrema sensibilidad para la detección de interacciones proteicas que supera la de otras aproximaciones de tipo bioquímico, incapaces de detectar determinadas interacciones proteína/proteína por lo transitorio de la interacción, la poca abundancia de las especies proteicas o por la debilidad de la interacción (135). El Sistema de Doble Híbrido más utilizado, denominado tradicional en esta tesis, se basa en la reconstitución del activador transcripcional Gal4 cuando dos proteínas de fusión generadas interactúan en el núcleo. Esta peculiaridad dificulta grandemente su uso con proteínas con dominios de activación de la transcripción (135-137), tal es el caso de Smad2. En esta tesis hemos utilizado la variante Cyto Trap® del Sistema Doble Híbrido, que se basa en su capacidad de detección de eventos de interacción en el citosol. De esta manera, a diferencia del Sistema Doble Híbrido tradicional, el uso de la variante Cyto Trap® nos permite estudiar interacciones de proteínas con función activadora o represora transcripcional, proteínas que requieren modificaciones post-traduccionales en el citoplasma y proteínas que son tóxicas para las levaduras en el Sistema Doble Híbrido tradicional (135). Por tanto, la búsqueda de nuevas proteínas que interactúan con Smad2 tiene que llevarse a cabo mediante el Sistema Doble Híbrido Cyto Trap®.

La cepa de *S. cerevisiae* utilizada en este método, *cdc25H* (α), tiene una mutación puntual en el residuo 1328 del gen *cdc25* (138). El gen *cdc25* de *S. cerevisiae*, homólogo del gen humano *SOS* (*hSOS*), codifica un factor intercambiador de guanina que se une y activa a Ras iniciando su señalización (139). La mutación que contiene la mencionada cepa impide la activación de Ras a 37 °C (condiciones restrictivas), confiriendo un fenotipo termosensible en el que las células no proliferan. Sin embargo, a 25 °C (condiciones permisivas) presenta una proliferación óptima. Dicha cepa presenta además auxotrofia para varios aminoácidos, entre ellos leucina y uracilo, que es utilizada para la selección de los plásmidos pSos y pMyr, respectivamente, por complementación.

El Sistema Doble Híbrido Cyto Trap[®] es un método para detectar interacciones proteína-proteína *in vivo* que está basado en la generación de proteínas de fusión y se fundamenta en la habilidad de la proteína hSos para complementar el defecto del gen *cdc25* y activar la señalización de Ras en condiciones restrictivas. Los híbridos que se generan en este sistema son, por una parte, la fusión traduccional de hSos con la proteína de interés (cebo) en un plásmido llamado pSos. Por otro lado, las diferentes proteínas a ensayar (presa) se fusionan traduccionalmente, utilizando el plásmido pMyr, a una secuencia aminoacídica miristilada que ancla la proteína de fusión a la membrana plasmática. Ambos híbridos son expresados en células de *S. cerevisiae* que son incubadas a la temperatura restrictiva de 37 °C. La interacción de las dos proteínas, cebo y presa, causa la localización de la proteína funcional hSos desde el citosol a la membrana citoplasmática, lo que activa la señalización de Ras e induce la proliferación de la cepa *cdc25H* (α) a 37 °C (Figura 14).

La selección de los clones que expresan proteínas que interaccionan con la proteína cebo ha de cumplir varios criterios a la vez. La temperatura de incubación es un determinante crítico para la proliferación de las levaduras, la cepa de *S. cerevisiae* *cdc25H* (α) prolifera de manera óptima a 25 °C mientras que a 37 °C no prolifera. La proliferación de la levadura en condiciones restrictivas sólo es posible si existe una interacción entre la proteína cebo fusionada a hSos y la proteína fusionada a Myr, provocando la activación de Ras y por tanto la proliferación celular (Figura 14). Para ello, previamente se han de seleccionar la expresión de los plásmidos pSos y pMyr mediante la supresión de los aminoácidos leucina y uracilo del medio de cultivo sintético. Además, se debe inducir la expresión de la proteína codificada por el plásmido pMyr por la presencia de galactosa en el medio de cultivo.

El Sistema Doble Híbrido Cyto Trap[®] es una herramienta que ha sido utilizada con éxito previamente por otros grupos de investigación. Las interacciones determinadas mediante el Sistema Doble Híbrido Cyto Trap[®] han podido ser posteriormente validadas en sistemas *in vivo*, lo que nos da una idea de la efectividad del método. Con el uso de esta herramienta se han determinado nuevas interacciones entre proteínas como son la interacción entre VDCA 1 y la proteína dynein light chain

Tctex-1 ó con la proteína PBP74 (140); Btn2p y Yif1p (141); ARA55 y Pyk2 (142); y HSF1 y RalBP1 (143), entre muchos otros casos.

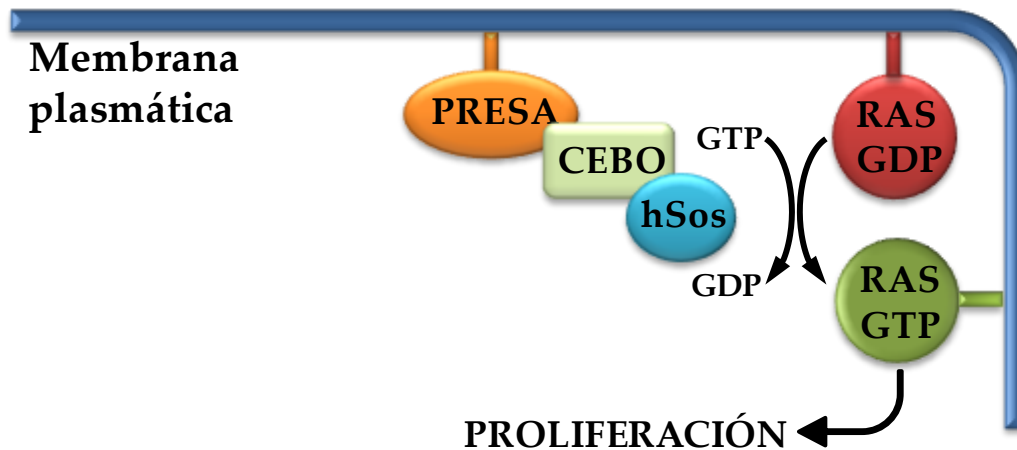


Figura 14. Fundamento de la proliferación de las levaduras en el Sistema Doble Híbrido Cyto Trap®. La interacción de la proteína cebo y la proteína presa produce la localización de la proteína funcional hSos desde el citosol a la membrana citoplasmática, lo que activa la señalización de Ras, induciendo la proliferación de la cepa *cdc25H* (α) a 37 °C.

I.12. Objetivos de la tesis doctoral.

La aparente simpleza de la ruta de TGF β , lineal y no amplificada, no justifica adecuadamente la diversidad de respuestas biológicas que distintos tipos celulares son capaces de generar tras la estimulación con TGF β (134). La naturaleza pleiotrópica de la respuesta génica que genera TGF β puede ser explicada, al menos en parte, por la compleja regulación de la respuesta a TGF β que es específica del tipo celular, estado fisiológico de la célula estimulada, la concentración del ligando y la duración del estímulo (5). Por tanto, podemos especular que proteínas accesorias adicionales interaccionando con las Smads pueden ser, en gran medida, responsables de la variedad de fenómenos biológicos desencadenados por la estimulación con TGF β .

El propósito de esta tesis doctoral es la búsqueda, identificación y caracterización de nuevas proteínas que interaccionen con uno de los elementos

transductores de la cascada de señalización de TGF β , Smad2, mediante el uso del Sistema Doble Híbrido Cyto Trap®.

Del conjunto de proteínas halladas, se realizará un estudio funcional. El trabajo será entonces enfocado en el estudio de una de estas proteínas. Se estudiará la relación con Smad2 y su implicación en la señalización de TGF β . Para ello, se realizará un estudio de la interacción con Smad2 *in vivo* e *in vitro* y un estudio de la localización subcelular antes y durante la estimulación con TGF β . Finalmente, se determinará el rol de la nueva proteína en la transcripción inducida por TGF β .

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Sistema Doble Híbrido Cyto Trap®.

El Sistema Doble Híbrido Cyto Trap® es un método que permite detectar, *in vivo*, interacciones proteína-proteína basado en la generación de proteínas de fusión cuya interacción en el citoplasma de la levadura activa la vía de señalización de Ras induciendo la proliferación de la levadura (135). El kit utilizado para este procedimiento es el Kit de Stratagene llamado CytoTrap® XR Premade Libraries.

II.1.1 Plásmidos utilizados.

Los plásmidos utilizado en este método son los siguientes:

- **pSos:** Plásmido que genera una fusión traduccional de la proteína de interés (cebo) con la proteína humana Sos (hSos). Este vector contiene el DNA que codifica los aminoácidos 1 a 1067 de hSos y un sitio de clonación único 3', al que denominamos polilinker, con los puntos de corte de las siguientes enzimas de restricción: *BamHI*, *NcoI*, *SrfI*, *AatI*, *Sall*, *BssHII*, *MluI*, *SacI*, *NotI*, *SacII* y *PacI*. El promotor *ADH1* que controla la expresión de la proteína de fusión está constitutivamente activo. Contiene el gen de resistencia a ampicilina (*Amp^R*) y los orígenes de replicación de *S. cerevisiae* y *E. coli*, 2 μ y pUC, respectivamente. También contiene el gen biosintético de *S. cerevisiae* *LEU2* para la selección de los transformantes en *S. cerevisiae* basados en requerimientos nutricionales (135). En la figura 15 se detalla un esquema del plásmido pSos.

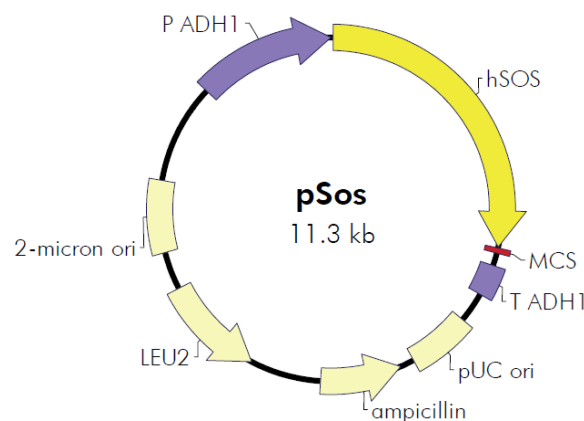


Figura 15. Plásmido pSos. Se indica la zona de clonación múltiple (polilinker) con las letras MCS. Figura extraída del kit CytoTrap® XR Premade Libraries (135).

- **pMyr:** Plásmido que contiene el DNA que expresa una fusión traduccional con secuencia de miristilación de localización en la membrana (Myr) y un polilinker único que es usado para la construcción de la librería de cDNA que contienen los insertos que codifican las proteínas diana. Este polilinker incluye los puntos de corte de las siguientes enzimas de restricción: *XbaI*, *EcoRI*, *SrfI*, *SmaI*, *XhoI*, *Sall* y *XbaI*. El promotor *GAL1*, que controla la expresión de la proteína de fusión miristilable, es inducido por la adición de galactosa al medio de cultivo y reprimido por la presencia de glucosa. Contiene el gen de resistencia a cloranfenicol (*Cam^R*) y los orígenes de replicación de *S. cerevisiae* y *E. coli*, 2μ y pUC, respectivamente. También contiene el gen biosintético de *S. cerevisiae* *URA3* para la selección de los transformantes de *S. cerevisiae* basados en requerimientos nutricionales (135). En la figura 16 se detalla un esquema del plásmido pMyr.

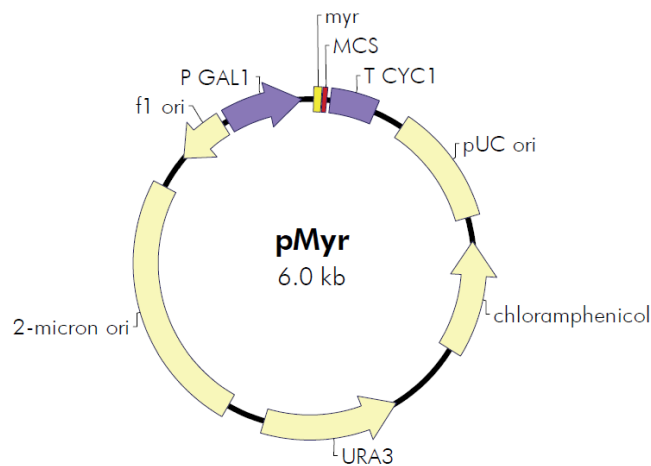


Figura 16. Plásmido pMyr. Se indica la zona de clonación múltiple (polilinker) con las letras MCS. Figura extraída del kit CytoTrap® XR Premade Libraries (135).

- **pMyr-Lamin C:** Plásmido control que expresa la proteína Lamin C (aminoácidos 67-230) con la señal de miristilación. Contiene el gen de resistencia a cloranfenicol (*Cam^R*) y el gen biosintético de *S. cerevisiae* *URA3* (135).

- **pSos-MAFB:** Plásmido control que expresa la proteína Sos fusionado a la proteína MAFB como proteína híbrida. Contiene el gen de resistencia a ampicilina (*Amp^R*) y el gen biosintético de *S. cerevisiae* *LEU2* (135).

- **pMyr-MAFB:** Plásmido control que expresa la proteína híbrida que contiene la señal de miristilación fusionada a la proteína MAFB. Contiene el gen de resistencia a cloranfenicol (*Cam^R*) y el gen biosintético de *S. cerevisiae URA3* (135).

Las proteínas de fusión codificadas por pSos-MAFB y pMyr-MAFB interaccionan *in vivo* y se utilizan como un control positivo de interacción. Las proteínas de fusión codificadas por pSos-MAFB y pMy-Lamin C no interaccionan *in vivo* y se utilizan como un control negativo de interacción.

II.1.2 Clonación de la proteína cebo en el plásmido pSos.

Como proteína cebo se clonaron diferentes fragmentos de la proteína Smad2 en el vector pSos. Se amplificaron los distintos fragmentos por PCR y se clonaron utilizando las enzimas de restricción indicadas (Tabla 2).

DNA	NÚMERO IDENTIFICATIVO	COMENTARIOS	PRIMERS USADOS (Nº)	PLÁSMIDO ORIGEN
Smad2 1-468 (MH1-L-MH2)	pFJNm-56	Inserto y Vector: <i>NcoI/SacI</i>	F:16/R:17	GFP-Smad2*
Smad2 1-173 (MH1)	pFJNm-206	Inserto y Vector: <i>NcoI/SacI</i>	F:16/R:64	GFP-Smad2*
Smad2 173-273 (L)	pFJNm-211	Inserto y Vector: <i>NcoI/SacI</i>	F:18/R:65	GFP-Smad2*
Smad2 273-468 (MH2)	pFJNm-209	Inserto y Vector: <i>NcoI/SacI</i>	F:63/R:17	GFP-Smad2*
Smad2 1-273 (MH1-L)	PFJNm-208	Inserto y Vector: <i>NcoI/SacI</i>	F:16/R:65	GFP-Smad2*
Smad2 173-468 (L-MH2)	PFJNm-26	Inserto y Vector: <i>NcoI/SacI</i>	F:18/R:17	GFP-Smad2*
Smad2 94-468 (1/2MH1-L-MH2)	pFJNm-207	Inserto y Vector: <i>NcoI/SacI</i>	F:62/R:17	GFP-Smad2*
Smad2 94-273 (1/2MH1-L)	pFJNm-210	Inserto y Vector: <i>NcoI/SacI</i>	F:62/R:65	GFP-Smad2*

*Plásmido cedido por la Dra. Caroline Hill (Cancer Research UK) (20)

Tabla 2. Clonaciones de diferentes fragmentos de Smad2 en el vector pSos. Se indica el fragmento de DNA clonado, número identificativo, comentarios de clonación, primers usados y el plásmido origen de la clonación.

Todas estas clonaciones fueron verificadas para su uso como proteína cebo, evaluando su interacción con Smad4 (ver apartado III.1.1). Para dicha prueba se clonó Smad4 en el plásmido pMyr. Se amplificó Smad4 por PCR y se clonó utilizando las enzimas de restricción indicadas (Tabla 3).

DNA	NÚMERO IDENTIFICATIVO	COMENTARIOS	PRIMERS USADOS (Nº)	PLÁSMIDO ORIGEN
Smad4	pFJNm-19	Inserto y Vector: <i>EcoRI/XhoI</i>	F:6/R:7	GFP-Smad4*

*Plásmido cedido por la Dra. Caroline Hill (Cancer Research UK) (20)

Tabla 3. Clonación de Smad4 en el vector pMyr. Se indica el DNA clonado, número identificativo, comentarios de clonación, primers usados y el plásmido origen de la clonación.

II.1.3 Clonación de la librería de expresión en el plásmido pMyr.

La librería de expresión usada para la realización de esta búsqueda se obtuvo a partir de epitelio pulmonar humano adulto, en adelante se referirá en este trabajo como pMyr-Librería(PH). Esta librería está clonada en el vector pMyr. Dicha librería, contenida en el kit CytoTrap® XR Premade Libraries, es suplida en su primer pase de amplificación por lo que es necesario amplificarla y purificarla para su uso.

En primer lugar se realiza un proceso de titulación donde se siembran 1 y 10 µl de la librería que provee el kit en dos placas de Luria Broth (LB) con cloranfenicol (CAM). Posteriormente, se cuenta el número de colonias CAM resistentes en ambas placas y se calcula el número de unidades formadoras de colonias por ml (ufc/ml). Una vez determinado el número de ufc/ml se siembran el resto de transformantes en placas de LB-CAM de 15 cm de diámetro. Cada placa debe contener aproximadamente de $2-3 \times 10^4$ colonias. Dichas placas se incuban toda la noche a 37 °C. A continuación, se recogen cuidadosamente las bacterias con una espátula y LB líquido hasta formar una suspensión densa. Para la extracción del DNA plasmídico de la librería se utilizó el kit de QIAGEN Plasmid Maxi Kit. Se llevó a cabo según instrucciones de la casa comercial salvo una modificación: el lisado de las bacterias se filtró con lana de vidrio previo paso por la columna del kit con el fin de retener todo el DNA cromosómico liberado en la lisis previa.

Por último, y a modo de comprobación, se realizó una PCR con los primers específicos del plásmido pMyr sugeridos en el kit CytoTrap® XR Premade Libraries para comprobar la diversidad de tamaños de la librería (primer 40 y 41, tabla 5).

Solución utilizada en este protocolo:

- **LB Agar (por litro):** 10 g NaCl (SIGMA ALDRICH); 10 g Triptona (BD Biosciences); 5 g Yeast extract (BD Biosciences); 20 g Bacto agar. Ajustar el pH a 7,0 con 5 N NaOH (MERK). Añadir 3 ml de CAM esterilizado por filtro (10 mg/ml).

II.1.4 Levaduras.

La cepa de *S. cerevisiae* utilizada en este método es cdc25H (α) con genotipo MAT α ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801 trp1-901 leu2-3 112 cdc25-2 Gal⁺. La auxotrofia presente en esta cepa para los aminoácidos leucina y uracilo es utilizada en este sistema para la selección de los plásmidos pSos y pMyr, respectivamente. Además, esta cepa contiene una mutación puntual en el aminoácido 1328 del gen *cdc25* que le confiere un fenotipo termosensible en el que las células no proliferan a 37 °C, sin embargo, a 25 °C dicha cepa presenta una proliferación óptima (135).

II.1.5 Metodología del Sistema Doble Híbrido Cyto Trap®.

II.1.5.1 Preparación de células competentes cdc25 α .

La preparación de las células competentes cdc25 α se realizó conforme el protocolo descrito en el kit CytoTrap® XR Premade Libraries. Brevemente, las levaduras *S. cerevisiae* cdc25 α se cultivan en YPAD líquido durante toda la noche a 25 °C. Una vez han llegado a una OD₆₀₀ de 0,8 se centrifuga el cultivo. Posteriormente, se realiza un lavado con agua y se incuba en LISORB durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación se centrifuga y se le añade para un cultivo inicial de 300 ml:

- 300 μ l de LISORB.
- 640 μ l de DNA de espermatozoides de salmón (SIGMA ALDRICH).
- 5,4 ml de PEG/LioAc.
- 530 μ l de dimetil sulfoxido (DMSO) (SIGMA ALDRICH).

Se cultiva una pequeña alícuota de las levaduras *S. cerevisiae cdc25 α* a 37 °C para comprobar la característica termosensible de la estirpe. Si después de 4-6 días a 37 °C la placa contiene más de 30 colonias, el cultivo contiene un alto número de levaduras termorrevertientes espontáneas por lo que las células competentes no son válidas.

Soluciones utilizadas en este protocolo:

- **YPAD:** Yeast extract al 1% (p/v); Bacto peptona al 2% (p/v) (BD Biosciences); Dextrosa al 2% (p/v) (SIGMA ALDRICH); Bacto agar al 2% (p/v) (si se quiere hacer sólido en placas); 40 mg Adenine sulfato (SIGMA ALDRICH).
- **LiSORB (por litro):** 100 mM LiOAc (SIGMA ALDRICH); 10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA (SIGMA ALDRICH); 1 M Sorbitol; Verificar que el pH es 8,0.
- **Solución PEG/LiOAc:** 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) (SIGMA ALDRICH); 1 mM EDTA (pH 8,0); 100 mM LiOAc (pH 7,5); PEG 3350 al 40% (p/v) (SIGMA ALDRICH).

II.1.5.2 Búsqueda de moléculas que interaccionan con la proteína cebo.

La búsqueda de clones que interaccionan con la proteína cebo (en nuestro caso, Smad2 Δ 93, ver apartado III.1.1) consiste en la co-transformación con los plásmidos pSos-cebo y pMyr-Librería(PH) de levaduras *S. cerevisiae cdc25 α* competentes, la posterior selección de ambos plásmidos a una temperatura permisiva (25 °C), la identificación de los Candidatos Interactores mediante la transferencia de las colonias cultivadas a temperatura restrictiva (37 °C) en medio de galactosa y, por último, los Presuntos Clones Positivos son identificados entre los candidatos probando su proliferación dependiente de la presencia de galactosa a una temperatura restrictiva (37 °C) (Prueba de Interacción) (Figura 17).

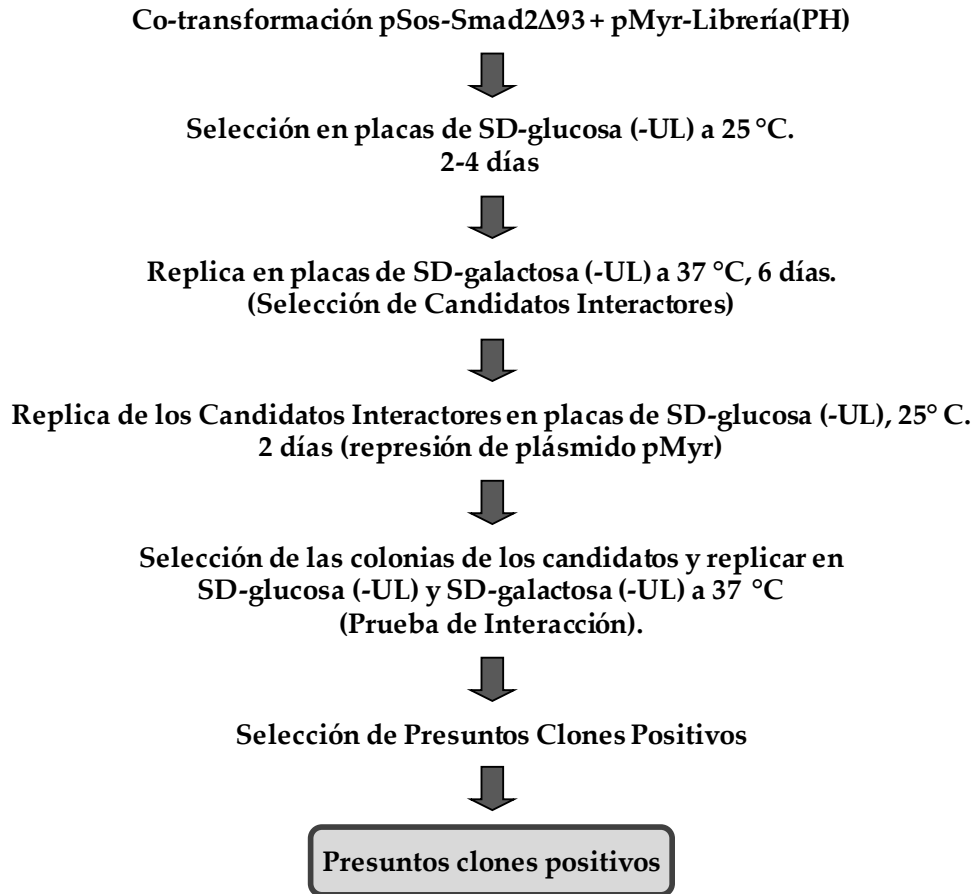


Figura 17. Protocolo de búsqueda de moléculas que interaccionan con la proteína cebo mediante el Sistema Doble Híbrido Cyto Trap®. Se detallan cada uno de los pasos seguidos en este protocolo hasta la obtención de los Presuntos Clones Positivos.

Para realizar la búsqueda de clones que interaccionen con pSos-Smad2Δ93, se añaden 40 µg de plásmido pSos-Smad2Δ93 (Smad2 94-468 (1/2MH1-L-MH2): proteína cebo), 40 µg de pMyr-Librería(PH) y 200 µl de 1,4 M β-mercaptoetanol (SIGMA ALDRICH) a 10 ml de levaduras *S. cerevisiae* *cdc25α* competentes previamente preparadas y se reparte en 20 tubos de microcentrífuga (Figura 17).

Por otro lado, se preparan los siguientes controles para la transformación:

1. 2 µg de pSos + 2 µg de pMyr-Librería(PH): control negativo de interacción.
2. 0,5 µg de pSos-Smad2Δ93 + 0,5 µg de pMyr-Smad4: control positivo de interacción.
3. 0,5 µg de pSos-MAFB + 0,5 µg de pMyr-MAFB: control positivo de interacción.
4. 0,5 µg de pSos-Smad2Δ93 + 0,5 µg pMyr: control negativo de interacción.

5. 0,5 µg de pSos-MAFB + 0,5 µg de pMyr-Lamin C: control negativo de interacción.

A cada uno de estos controles se añade 500 µl de levaduras *S. cerevisiae* cdc25α competentes y 10 µl de 1,4 M β-mercaptoetanol.

Se realiza una transformación química tanto a la transformación de pSos-Smad2Δ93 como a los controles; 30 minutos a temperatura ambiente, 20 minutos a 42 °C y 3 minutos a 4 °C. Posteriormente, se centrifuga a máxima velocidad durante 30 segundos y se resuspende el pellet con 500 µl de sorbitol 1 M (SIGMA ALDRICH). En el caso de la transformación de pSos-Smad2Δ93, se siembra la totalidad de la transformación mediante bolas de borosilicato estériles (SIGMA ALDRICH) en placas de SD-glucosa (-UL) agar de 15 cm de diámetro. Se hace lo mismo con el control 1. De los controles 2-5 se siembran 50 µl en placas de SD-glucosa (-UL) agar de 10 cm de diámetro.

Tras 2 días a 25 °C (Figura 17) se replican las placas de la transformación pSos-Smad2Δ93 y el control 1 sembradas en SD-glucosa (-UL) en una placa de SD-galactosa (-UL) utilizando un terciopelo esterilizado montado sobre un soporte redondo y se incuba a 37 °C (Figura 17). La placa de la transformación de pSos-Smad2Δ93 en SD-glucosa (-UL) a 25 °C se mantiene a esa temperatura para determinar posteriormente la eficacia de la transformación.

Tras 2 o 3 días se calculan en número de falsos positivos con la placa del control negativo 1 en SD-galactosa (-UL) a 37 °C. Por otro lado, se calcula la eficiencia de la transformación sobre las placas de SD-glucosa (-UL) a 25 °C de la transformación de pSos-Smad2Δ93. Se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Número de unidades formadoras de colonias (ufc) X volumen total de suspensión (500 µl)}}{\text{Volumen de la transformación sembrado (µl) X cantidad de DNA usado (µg)}} = \text{ufc/µg de DNA}$$

Se considera una buena eficacia de transformación cuando el valor oscila entre 10.000 a 20.000 colonias/placa. En este momento los controles 2-5 se guardan a 4 °C.

Tras 6 días en SD-galactosa (-UL) a 37 °C, se pican las colonias crecidas y se siembran en una placa de SD-glucosa (-UL) a 25 °C durante 48 horas. Estas colonias se denominan Candidatos Interactores. Este paso se realiza para reprimir la expresión del clon presente en el plásmido pMyr, que está controlado por el promotor *GAL1*, que es reprimido por glucosa y activado por galactosa (Figura 17). La placa de SD-galactosa (-UL) a 37 °C se deja incubando a esa temperatura.

Tras 48 horas de incubación en SD-glucosa (-UL) a 25 °C, esta placa se replica en SD-glucosa (-UL) y SD-galactosa (-UL) a 37 °C. En este momento, los controles 2-5 se siembran también en las mismas condiciones. Esta siembra se realiza de manera que los clones seleccionados (Candidatos Interactores) se dispongan en la placa en una cuadrícula de 7 clones en horizontal por 5 en vertical (ver apartado III.1.2). A esta etapa la hemos denominado Prueba de Interacción (Figura 17).

Tras 48 horas de incubación se evalúa la interacción de los clones y se seleccionan los clones cuya proliferación se produce en presencia de galactosa a temperatura restrictiva, criterio de selección utilizado para considerar dicha proliferación como una interacción válida (ver apartado III.1.2). A los clones seleccionados los llamamos Presuntos Clones Positivos (Figura 17). Para el resto de colonias que pudieran proliferar en la placa de SD-galactosa (-UL) que se ha quedado incubando a 37 °C se realiza también la Prueba de Interacción.

Soluciones utilizadas en este protocolo:

- **Medio mínimo sintético de glucosa [SD-glucosa (-UL)] (por litro):** 1,7 g Yeast nitrogen base sin aminoácidos (BD Biosciences); 5 g Sulfato de amonio (MERK); 20 g Dextrosa; 17 g Bacto agar (BD Biosciences); Ajustar el volumen a 900 ml con agua ultra pura; Autoclavar; Añadir 100 ml de "10X Dropout Solution" esterilizada mediante filtro.
- **Medio mínimo sintético de galactosa [SD-galactosa (-UL)] (por litro):** 1,7 g Yeast nitrogen base sin aminoácidos; 5 g Sulfato de amonio; 20 g Galactosa (SIGMA ALDRICH); 10 g Rafinosa (ACROS ORGANICS); 17 g Bacto agar;

Ajustar el volumen a 900 ml con agua ultra pura; Autoclavar; Añadir 100 ml de “10X Dropout Solution” esterilizada mediante filtro.

- **“10X Dropout Solution”:** Para preparar el medio de selección sintético, simplemente omitimos los componentes apropiados. En este trabajo se ha utilizado esta solución omitiendo leucina y uracilo para seleccionar los plásmidos pSos y pMyr, respectivamente. Todos los aminoácidos y nutrientes fueron autoclavados a excepción de treonina y ácido aspártico que fueron filtrados. Después de la esterilización, almacenamos la solución a 4 °C. En la tabla 4 se detallan los diferentes componentes de esta solución.

COMPONENTES	MG/LITRO	Nº DE CATÁLOGO (SIGMA)
L-Isoleucina	300	I 2752
L-Valina	1.500	V 0500
L-Adenina hemisulfato sal	200	A 9126
L-Arginina HCl	500	A 5131
L-Histidina HCl monohidrato	200	H 8125
L-Leucina	1.000	L 8000
L-Lysina HCl	500	L 5626
L-Metionina	200	M 9625
L-Fenilalanina	500	P 2126
L-Treonina	2.000	T 8625
L-Triptofano	500	T 0254
L-Tirosina	500	T 3754
L-Uracilo	200	U 0750
Ácido L -Glutamico	1.000	G 1251
Ácido L -Aspartico	1.000	A 9256
L -Serina	400	S 4500

Tabla 4. Componentes de “10X Dropout Solution”. Se detalla el nombre de los componentes de la “10X Dropout Solution”, la concentración utilizada y el número de catálogo de SIGMA ALDRICH.

II.1.5.3 Aislamiento del plásmido pMyr de levaduras.

Una vez seleccionados los Presuntos Clones Positivos, se procede a la extracción del plásmido pMyr de las levaduras *S. cerevisiae* cdc25α. Este procedimiento se realizó siguiendo el protocolo descrito en el manual del kit CytoTrap® XR Premade Libraries.

Brevemente, se inocula cada uno de los Presuntos Clones Positivos en 5 ml de SD-glucosa (-UL) y se incuba a temperatura ambiente hasta llegar a una OD₆₀₀ mayor que 1. Dicho cultivo se centrifuga y el pellet se resuspende en 0,3 ml de "Solución de lisado para la extracción de DNA de levaduras" junto con 50 µl de bolas de vidrio lavadas al ácido (0,5 mm) (SIGMA ALDRICH) y se procede a la extracción del DNA mediante el método de Fenol/Cloroformo (ver apartado II.5.1.3). Finalmente, el DNA extraído se precipita mediante el protocolo precipitación por etanol (ver apartado II.5.1.3) y se resuspende en 20 µl de agua ultra pura.

Solución utilizada en este protocolo:

- **Solución de lisado para la extracción de DNA de levaduras:** 2,5 M LiCl (SIGMA ALDRICH); 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) (SIGMA ALDRICH); Triton X-100 al 4% (v/v); 62,5 mM EDTA.

II.1.5.4 Transformación en bacterias electrocompetentes DH10B y selección de colonias.

Para la identificación de los Presuntos Clones Positivos, la estirpe de *E. coli* DH10B electrocompetente se transforman con el DNA extraído de las levaduras *S. cerevisiae* cdc25α de los Presuntos Clones Positivos seleccionados. Para transformar, se dializan durante 20 minutos 5 µl de los plásmidos pMyr seleccionados. Tras la dialización, se electropora la cepa de *E. coli* DH10B electrocompetente con el DNA plasmídico dializado con el electroporador Gen Pulser® II de BIORAD. Para ello, el DNA dializado se mezcla con 30 µl de bacterias DH10B y se incuba 30 minutos en hielo. Seguidamente, se someten las bacterias a un campo eléctrico de características: 200 Ohm, 25 µF y 1,7 KV.

Tras la electroporación se añade 1 ml LB, se siembra en una placa de LB agar suplementada con CAM (30 µg/ml) y se incuba toda la noche a 37 °C. De la placa incubada se seleccionan 6 colonias de cada DNA electroporado y el DNA se extrae mediante el método de lisis alcalina (ver apartado II.5.1.1).

II.1.5.5 Digestión de los clones pMyr seleccionados como Presuntos Clones Positivos.

Los plásmidos pMyr anteriormente seleccionados se digieren con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI* (TAKARA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez digeridos los plásmidos se cargan en un gel de agarosa al 0,8% (p/v) y se selecciona un representante de cada uno de los tamaños de inserto.

II.1.5.6 Verificación de la interacción de los Presuntos Clones Positivos.

Los clones seleccionados se someten a una verificación de la interacción con el fin de comprobar que interaccionan con nuestra proteína cebo pSos-Smad2 Δ 93. Esta prueba consiste en la transformación de levaduras *S. cerevisiae* *cdc25 α* competentes con cada uno de los Presuntos Clones Positivos y pSos-Smad2 Δ 93 o con un cebo irrelevante, en nuestro caso, pSos. Posteriormente, se seleccionan las colonias a temperatura permisiva y por último los Clones Positivos Confirmados son seleccionados mediante una Prueba de Interacción (Figura 18).

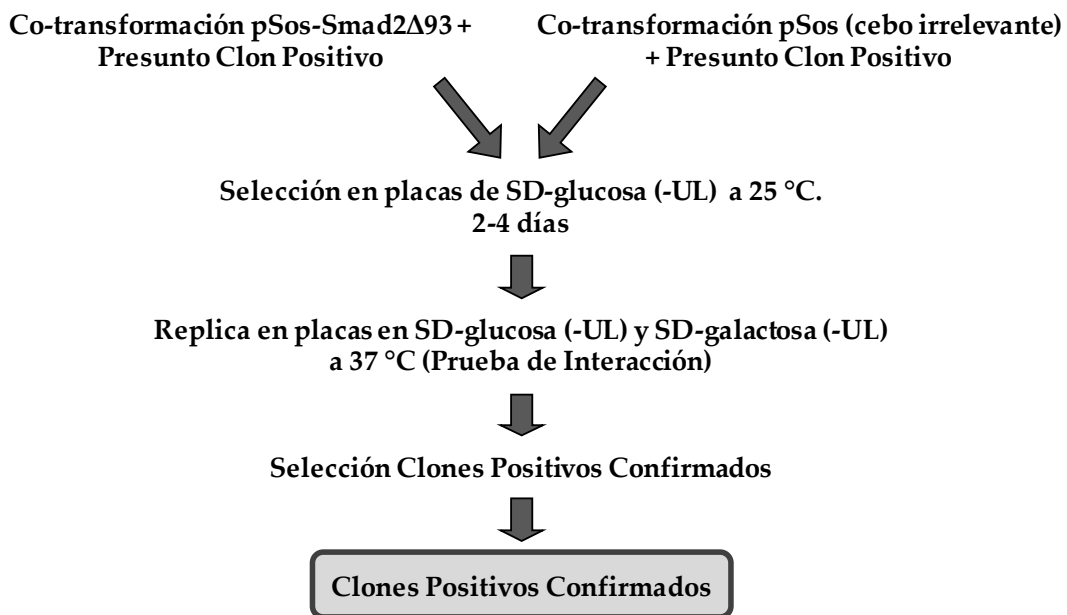


Figura 18. Protocolo de verificación de la interacción de los Presuntos Clones Positivos. Se detallan cada uno de los pasos seguidos en este protocolo hasta la obtención de los Clones Positivos Confirmados.

En la verificación de la interacción, para cada DNA seleccionado se hacen dos transformaciones distintas en levaduras *S. cerevisiae* *cdc25* α (Figura 18):

- Transformación 1: pMyr seleccionado + pSos.
- Transformación 2: pMyr seleccionado + pSos-Smad2 Δ 93.

Para cada una de las transformaciones se mezclan 300 ng del DNA seleccionado, 300 ng de pSos ó pSos-Smad2 Δ 93, 50 μ l de levaduras *S. cerevisiae* *cdc25* α competentes y 2 μ l de 1,4 M β -mercaptoetanol. Cada una de las transformaciones se realizó por duplicado.

Además, se preparan los siguientes controles:

- 0,5 μ g de pSos-MAFB + 0,5 μ g de pMyr-MAFB: control positivo de interacción.
- 0,5 μ g de pSos-MAFB + 0,5 μ g de pMyr-Lamin C: control negativo de interacción.
- 0,5 μ g de pSos-Smad2 Δ 93 + 0,5 μ g pMyr-Smad4: control positivo de interacción.
- 0,5 μ g de pSos-Smad2 Δ 93 + 0,5 μ g pMyr: control negativo de la interacción.

A estos controles se les añade 100 μ l de las levaduras *S. cerevisiae* *cdc25* α competentes y 2 μ l de 1,4 M β -mercaptoetanol.

Tras la mezcla, se realiza una transformación química de las transformaciones 1 y 2 y de los diferentes controles; 30 minutos a temperatura ambiente, 20 minutos a 42 °C y 3 minutos a 4 °C. Posteriormente, se centrifuga a máxima velocidad durante 30 segundos y se resuspende el pellet con 50 μ l de sorbitol 1 M. A continuación, se siembran 3 μ l por cada transformación en placas de SD-glucosa (-UL) de manera que se dispongan en la placa en una cuadrícula de 8 gotas en horizontal por 5 gotas en vertical (ver apartado III.1.3) y se incuban a 25 °C durante 2 días (Figura 18).

Tras 2 días, se replica la placa cultivada en SD-glucosa (-UL) a 25 °C a SD-glucosa (-UL) y SD-galactosa (-UL) a 37 °C (Prueba de Interacción) (Figura 18).

Finalmente, se evalúa la interacción tras 48 horas de incubación según los criterios expuestos en la tabla 31 de Resultados y se seleccionan los llamados Clones Positivos Confirmados.

II.1.5.7 Secuenciación e identificación de los plásmidos pMyr seleccionados.

Una vez seleccionados los plásmidos pMyr que interaccionan específicamente con pSos-Smad2 Δ 93 (Clones Positivos Confirmados), dicho DNA se secuencia con el kit BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem) según indicaciones del fabricante. Se secuenciaron los primeros 400 nucleótidos de ambos extremos de cada Clon Positivo Confirmado con los primers apropiados (40 y 41, tabla 5).

Una vez secuenciados, se alinean y clasifican los distintos plásmidos en grupos atendiendo a su identidad de secuencia con el programa DNASTar SeqMan[™] II (expert sequence analysis software). Para la identificación de los grupos de DNA, se utilizó la herramienta del EMBL-EBI denominada Fasta que realiza la búsqueda de secuencias con alto porcentaje de similitud a la secuencia desconocida sobre una gran variedad de bases de datos (144). Se utilizó la base de datos europea EMBL Nucleotide Sequence Database library (145). Para la búsqueda de información de los clones obtenidos se utilizó la web Information Hiperlink Over Proteins (iHOP) (146, 147). Por último, el análisis de agrupamiento funcional se realizó mediante el uso de la herramienta Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) Bioinformatics Resources 6.7 (148), utilizando la base de datos SP_PYR que contiene la información de dos bases de datos de proteínas; Swiss-Prot (SP) y Protein Information Resource (PIR). Este último análisis se realizó con la colaboración de la Dra. Agudo, investigadora de la Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias (FFIS).

II.2. Plásmidos y clonaciones.

II.2.1 Protocolo general de clonación.

II.2.1.1 Clonación por PCR.

En todas las clonaciones del presente trabajo realizadas por PCR, el fragmento de DNA a clonar se obtuvo a partir de otro vector donde éste estaba previamente clonado.

En primer lugar, se amplifica la secuencia de interés por PCR con la enzima PfuUltra™ II Fusion HS DNA Polimerasa (STRATAGENE) con primers específicos en cuyo extremo 5' se han generado las secuencias de las enzimas de restricción seleccionadas para la clonación. La PCR se realizó según instrucciones de la casa comercial. Posteriormente, se incubó el producto de PCR con la enzima Taq polimerasa durante 10 minutos a 72 °C para añadir una adenina a los extremos 3' del fragmento de DNA amplificado, se carga en un gel de agarosa y se purifica la banda digerida mediante el kit de QIAGEN QIAquick Gel Extraction Kit. El fragmento de DNA amplificado se liga al vector pCR®2.1-TOPO® del kit TOPO TA cloning de Invitrogen. El protocolo de ligación se realizó según indicaciones del fabricante.

Posteriormente, se transforma la cepa de *E. coli* DH10B electrocompetente con dicha ligación (ver apartado II.1.5.4). Para comprobar que los vectores contienen el inserto ligado, se seleccionan 10 colonias de la transformación y se realiza una PCR de colonias: PCR estándar con taq polimerasa y primers específicos del vector pCR®2.1-TOPO® suplidos por el kit, M13F y M13R (primer 152 y 153, respectivamente, tabla 5). Como fuente de DNA se utiliza una colonia.

De las colonias positivas para el inserto, se extrae el DNA plasmídico mediante el kit de QIAGEN QIAprep Spin Miniprep Kit y se secuencian dichos DNA con los primers M13F y M13R utilizando el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit de Applied Biosystem según indicaciones del fabricante.

Si el fragmento insertado en el vector pCR[®]2.1-TOPO[®] es el correcto, se digiere con las enzimas de restricción elegidas para la clonación y se purifica mediante el kit de QIAGEN QIAquick Gel Extraction Kit. Por otro lado, se corta el vector donde se va a clonar el fragmento con las enzimas de restricción elegidas para la clonación.

Después de las digestiones se pueden dar las siguientes situaciones:

1. Si la digestión del vector y el inserto se realiza con enzimas de restricción distintas entre sí, es necesario la generación de extremos romos para poder realizar la ligación. Para ello, se trata tanto el fragmento de DNA como el vector con Klenow Fragment (Large Fragment *E. coli* DNA Polymerase I) (TAKARA) según instrucciones del fabricante. Para evitar la autoligación del vector tras el tratamiento con Klenow Fragment, se desfosforila dicho vector con Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (Roche). El protocolo de desfosforilación se realizó según indicaciones del fabricante.
2. En el caso de que el vector se digiera con un solo tipo de enzima de restricción también es necesario el tratamiento con SAP para evitar su autoligación.
3. En el resto de casos no es necesario realizar ningún tratamiento.

A continuación, tanto el inserto como el vector se purifican mediante el kit de QIAGEN QIAquick Gel Extraction Kit. Posteriormente, se liga el vector con el inserto con la enzima T4 DNA ligasa de New England Biolabs siguiendo las instrucciones del fabricante y se incuba toda la noche a 4 °C para extremos romos o 16 °C para cohesivos. Tras la incubación, se transforma la cepa de *E. coli* DH10B electrocompetente con el producto de la ligación previa dialización (ver apartado II.1.5.4).

Para detectar colonias con plásmido que han integrado el fragmento de DNA, se realiza una PCR de colonias (previamente descrita en este apartado) y se extrae el DNA de las colonias positivas en la PCR mediante el kit de QIAGEN QIAprep Spin Miniprep Kit. Finalmente, se secuencia utilizando el kit BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit de Applied Biosystem según indicaciones del fabricante.

A continuación, en la tabla 5 se detalla la lista de los primers utilizados para las clonaciones y secuenciaciones realizadas en este trabajo (desarrolladas en los apartados II.1.2, II.1.3, II.1.5.7 y II.2.2).

NOMBRE	NÚMERO IDENTIFICATIVO	SECUENCIA
Smad4 F	6	GAATTCATGGACATGTCTATTAC
Smad4 R	7	CTCGAGTCAGTCTAAAGGTTGTGGG
Smad2F-1 pSos	16	CCATGGCCATGTCGTCCATCTTGCC
Smad2R-1400 pSos	17	GAGCTCTTATGACATGCTTGAGC
Smad2F-500 pSos	18	CCATGGCCCAGAGAGTTGAGACACC
Myr3'	40	CGTGAATGTAAGCGTGACAT
Myr5'	41	ACTACTAGCAGCTGTAATAC
Smad2F-290 pSos	62	CCATGGATCAGTGGGATACAACAGG
Smad2F-800 pSos	63	CCATGGTTACTTACTCAGAACCTGC
Smad2R-500 pSos	64	GAGCTCGTCGGGGCACTAATACTGG
Smad2R-800 pSos	65	GAGCTCATCGAACACCAAAATGCAGG
Smad2F NcoI	98	CCATGGCCATGTCGTCCATCTTGCCATTC
Smad2R SpeI	99	ACTAGTTTATGACATGCTTGAGCAAC
Smad4F NcoI	100	CCATGGACAATATGTCTATTAC
Smad4R SpeI	101	ACTAGTTCAGTCTAAAGGTTGTGG
K19,20R F	106	GACTGCTGGGATGGAGGAGGTCAGCTGGTGGGTC
K19,20R R	107	GACCCACCAGCTGACCTCCTCCATCCCAGCAGTC
K39R F	108	CAGAATGGGCAGGAAGAAAGGTGGTGTGAGAAAAGC
K39R R	109	GCTTTCTCACACCACCTTTCTCCTGCCATTCTG
K39Q F	114	GCAGAATGGGCAGGAAGAACAGTGGTGTGAGAAA
K39Q R	115	TTTCTCACACCACTGTTCTCCTGCCATTCTG
K19,20Q F	116	GACTGCTGGGATGGCAGCAGTCAGCTGGTGGG
K19,20Q R	117	CCCACCAGCTGACTGCTGCCATCCCAGCAGTC
Smad2AAMA R	132	ACTAGTTTATGCCATGGCTGCGCAACGCACTGAAGG
Sirt1H363Y F	136	CCAAAGGATAAATTCAGTGTTATGGTTCCTTTGCAACAGC
Sirt1H363Y R	137	GCTGTTGCAAAGGAACCATAACACTGAATTATCCTTTGG
Smad2AAMA F	145	GTTGCGCAGCCATGGCATAAACTAGTCTAGAAATTCACCC
Smad3F NcoI	146	CCATGGCCATGTCGTCCATCCTGCC
Smad3R SpeI	147	ACTAGTCTAAGACACACTGGAAC
GFPP	148	AATAGTAATCAATTACGGGG
GFPR	149	CGCGTTAAGATACATTGATG
M13F	152	GTAACGACGGCCAG
M13R	153	CAGGAAACAGCTATGAC
Sirt1F SphI	285	ATGGCCGGATCGATCCGCATGCATTCTAGAGCGGACG
Sirt1R BamHI	284	GGATCCTGATTTGTTGATGGATA
Sirt1F-500 SphI	305	GCATGCTGATTGGCACAGATCCTCGAAC

Sirt1R-500 BamHI	306	GGATCCTGTTTCGAGGATCTGTGCCAAT
Sirt1F-1100 SphI	307	GCATGCGTCATGGTTCCTTTGCAACAG
Sirt1R-1100 BamHI	308	GGATCCTGTTGCAAAGGAACCATGA
Sirt1F-1600 SphI	309	GCATGCCACCAGAAAGAACTTCACCACCA
Sirt1R-1600 BamHI	310	GGATCCTGGTGGTGAAGTTCCTTTCTGG
Sirt1F Sall	311	GTCGACATGGCGGACGAGGCGG
Sirt1R BamHI	312	GGATCCCTATGATTTGTTTGGAT

Tabla 5. Lista de primer usados en las clonaciones/secuenciaciones de este trabajo. Se indica nombre, número identificativo y secuencia.

II.2.1.2 Clonación por digestión enzimática.

Este método se diferencia del anterior en la manera de obtener el fragmento de DNA a clonar. En esta ocasión, en vez de realizarse por amplificación del fragmento, se realiza mediante la digestión enzimática de otro vector donde dicho DNA está previamente clonado. El resto del protocolo es exactamente igual al descrito en el apartado anterior.

II.2.2 Plásmidos utilizados y clonaciones realizadas.

- **pEF-Flag:** plásmido de 4,8 Kb que produce una fusión traduccional del epitopo Flag y la proteína de interés que está bajo el control del promotor *EF-1α* (149). Este promotor permite expresar altos niveles del gen de interés de manera constitutiva en la mayoría de tipos celulares. Contiene el gen de resistencia a ampicilina (*Amp^R*) que permite su selección en bacterias y una amplia zona de clonación (polilinker) que facilita la clonación de la proteína de interés. Dicho polilinker incluye los puntos de corte de las siguientes enzimas de restricción: *NcoI*, *BamHI*, *EcoRI*, *Clal*, *SpeI* y *XbaI*. En este trabajo se ha usado para la expresión de las diferentes proteínas en su longitud total o fragmentos de ellas que se detallan en la tabla 6.

DNA	NÚMERO IDENTIFICATIVO	COMENTARIOS	PRIMERS USADOS (Nº)	PLÁSMIDO ORIGEN
Smad2	pFJNm-246	Clonación por PCR. Inserto y Vector: <i>NcoI/SpeI</i>	F:98/R:99	GFP-Smad2*3
Smad2 AAMA	pFJNm-294	Mutagénesis dirigida sobre el plásmido origen *1	F:145/R:132	pFJNm-246
Smad2 K19,20,39R	PFJNm-270	Mutagénesis dirigida sobre el plásmido origen *1	F:106/R:107 (K19,20) F:108/R:109 (K39)	pFJNm-246
Smad2 K19,20,39Q	PFJNm-273	Mutagénesis dirigida sobre el plásmido origen *1	F:116/R:117 (K19,20) F:114/R:115 (K39)	pFJNm-246
Smad3	pFJNm-315	Clonación por PCR. Inserto y Vector: <i>NcoI/SpeI</i>	F:146/R:147	GFP-Smad3*3
Smad4	pFJNm-253	Clonación por PCR. Inserto y Vector: <i>NcoI/SpeI</i>	F:100/R:101	GFP-Smad4*3
Sirt1	pFJNm-193	Clonación por digestión enzimática: Inserto: <i>Xba</i> (romo)/ Vector: <i>EcoRI</i> (romo)	NO	pMyr-Sirt1
Sirt1H363Y	pFJNm-279	Mutagénesis dirigida sobre el plásmido origen *1	F:136/R:137	pFJNm193
Mixer	pFJNm-336	*2	NO	NO
FoxH1	pFJNm-339	*2	NO	NO

*1: Mutación generada sobre el plásmido origen con el kit de mutagénesis de Stratagen llamado "QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit". Para la generación de la mutación se siguió el protocolo indicado por el fabricante. La generación de los mutantes Smad2 K19,20,39R y Smad2 K19,20,39Q se realizó mediante una mutación secuencial donde se mutagenizaron primero los residuos de lisina 19 y 20 y posteriormente el residuo de lisina 39.

*2: Plásmidos cedidos por la Dra. Caroline Hill (Cancer Research UK). Plásmidos clonados en pEF (149) y descritos previamente (66).

*3: Plásmidos cedidos por la Dra. Caroline Hill (Cancer Research UK) (20).

Tabla 6. Clonaciones realizadas en el vector pEF-Flag. Se indica el DNA clonado, número identificativo, comentarios de clonación, primers usados y el plásmido origen de la clonación.

- **pEF-HA:** mismo plásmido que pEF-Flag donde se ha empleado HA en vez de Flag. Este plásmido produce una fusión traduccional del epitopo HA y la proteína de interés. En este trabajo se ha usado para la expresión de las diferentes proteínas que se detallan en la tabla 7.

DNA	NÚMERO IDENTIFICATIVO	COMENTARIOS	PRIMERS USADOS (Nº)	PLÁSMIDO ORIGEN
Smad2	pFJNm-249	Clonación por PCR. Inserto y Vector: <i>NcoI/SpeI</i>	F:98/R:99	GFP-Smad2*2
Sirt1	pFJNm-194	Clonación por digestión enzimática: Inserto: <i>XbaI</i> (romo)/ Vector: <i>EcoRI</i> (romo)	NO	pMyr-Sirt1
Sirt1H363Y	pFJNm-280	Mutagénesis dirigida sobre el plásmido origen *1	F:136/R:137	pFJNm-194
Mixer	pFJNm-335	*2	NO	NO

*1: Mutación generada sobre el plásmido origen con el kit de mutagénesis de Stratagen llamado "QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit". Para la generación de la mutación se siguió el protocolo indicado por el fabricante.

*2: Plásmidos cedidos por la Dra. Caroline Hill (Cancer Research UK) (20).

Tabla 7. Clonaciones realizadas en el vector pEF-HA. Se indica el DNA clonado, número identificativo, comentarios de clonación, primers usados y el plásmido origen de la clonación.

- **pEF-Myc:** mismo plásmido que pEF-Flag donde se ha empleado Myc en vez de Flag. Este plásmido produce una fusión traduccional del epitopo Myc y la proteína de interés. En este trabajo se ha usado para la expresión de las diferentes proteínas que se detallan en la tabla 8.

DNA	NÚMERO IDENTIFICATIVO	COMENTARIOS	PRIMERS USADOS (Nº)	PLÁSMIDO ORIGEN
Smad4	pFJNm-257	Clonación por PCR. Inserto y Vector: <i>NcoI/SpeI</i>	F:100/R:101	GFP-Smad4*1
Sirt1	pFJNm-192	Clonación por digestión enzimática: Inserto: <i>XbaI</i> (romo)/ Vector: <i>EcoRI</i> (romo)	NO	pMyr-Sirt1

*1: Plásmido cedido por la Dra. Caroline Hill (Cancer Research UK) (20).

Tabla 8. Clonaciones realizadas en el vector pEF-Myc. Se indica el DNA clonado, número identificativo, comentarios de clonación, primers usados y el plásmido origen de la clonación.

- **pEF-XC:** Plásmido que contiene un punto de origen SV40, el promotor *EF-1α* y un polilinker que facilita la clonación de la proteína de interés. Este plásmido es usado para equilibrar la concentración de DNA en los experimentos de transfección en células eucarióticas. Al tener el promotor *EF-1α*, normaliza la cantidad total de promotor en

las transfecciones donde se ha utilizado el plásmido pEF. Plásmido cedido por la Dra. Caroline Hill (Cancer Research UK) (150). Número identificativo: pFJNm-131.

- **pGEX-4T-1:** Plásmido comercial de la casa GE Healthcare de 4,9 Kb que produce altos niveles de expresión de proteína recombinante fusionada a GST. Esta expresión está bajo el control de un promotor llamado taq el cual es inducible por IPTG. Presenta un gen que confiere resistencia a ampicilina (*Amp^R*) que permite su selección en bacterias y un amplio polilinker con los puntos de corte de las siguientes enzimas de restricción: *BamHI*, *EcoRI*, *SmaI*, *Sall*, *XhoI* y *NotI*. El plásmido provee un represor lac. En este trabajo se ha usado para la expresión de diferentes proteínas que se clonaron por digestión enzimática utilizando las enzimas de restricción detalladas en la tabla 9.

DNA	NÚMERO IDENTIFICATIVO	COMENTARIOS	PLÁSMIDO ORIGEN
Smad2 1-468 (MH1-L-MH2)	pFJNm-344	Inserto: <i>NcoI/SpeI</i> / Vector: <i>SmaI</i>	pFJNm-246
Smad2 1-173 (MH1)	pFJNm-300	Inserto: <i>NcoI/SpeI</i> / Vector: <i>SmaI</i>	Flag-Smad2 1-173 (MH1)
Smad2 173-273 (L)	pFJNm-302	Inserto: <i>NcoI/SpeI</i> / Vector: <i>SmaI</i>	Flag-Smad2 173-273 (L)
Smad2 273-468 (MH2)	pFJNm-345	Inserto: <i>NcoI/SpeI</i> / Vector: <i>SmaI</i>	Flag-Smad2 273-468 (MH2)
Smad2 1-273 (MH1-L)	pFJNm-305	Inserto: <i>NcoI/SpeI</i> / Vector: <i>SmaI</i>	Flag-Smad2 1-273 (MH1-L)
Smad2 173-468 (L-MH2)	pFJNm-303	Inserto: <i>NcoI/SpeI</i> / Vector: <i>SmaI</i>	Flag-Smad2 173-468 (L-MH2)
Smad3	pFJNm-355	Inserto: <i>EcoRI</i> / Vector: <i>SmaI</i>	pFJNm-315

Tabla 9. Clonaciones realizadas en el vector pGEX-4T-1. Se indica el DNA clonado, número identificativo, comentarios de clonación y el plásmido origen de la clonación.

- **pQE-70:** Plásmido comercial de la casa QIAGEN de aproximadamente 3,4 Kb. Contiene un polilinker con los puntos de corte de las siguientes enzimas de restricción: *SphI*, *BamHI* y *BglII*. La clonación de fragmentos de DNA en este vector permite la obtención de proteínas de fusión con una cola de 6 histidinas en su extremo carboxilo

terminal. Esta cola de histidinas facilita la posterior purificación de la proteína con resinas con Ni²⁺ conjugado. Además, contiene un gen de resistencia a ampicilina (*Amp^R*) que permite su selección en bacterias y un promotor llamado T5 que es inducible por IPTG. En este trabajo se ha usado para la expresión de diferentes proteínas (Tabla 10). Los DNAs correspondientes se amplificaron por PCR y se clonaron utilizando las enzimas de restricción indicadas en la tabla 10.

DNA	NÚMERO IDENTIFICATIVO	COMENTARIOS	PRIMERS USADOS (Nº)	PLÁSMIDO ORIGEN
Sirt1	pFJNm-542	Inserto y Vector: <i>SphI/BamHI</i>	F:285/R:284	pFJNm-194
Sirt1H363Y	pFJNm-543	Inserto y Vector: <i>SphI/BamHI</i>	F:285/R:284	pFJNm-280
Sirt1-A (1-197)	pFJNm-609	Inserto y Vector: <i>SphI/BamHI</i>	F:285/R:306	pFJNm-194
Sirt1-B (197-364)	pFJNm-610	Inserto y Vector: <i>SphI/BamHI</i>	F:305/R:308	pFJNm-194
Sirt1-C (364-543)	pFJNm-600	Inserto y Vector: <i>SphI/BamHI</i>	F:307/R:310	pFJNm-194
Sirt1-D (543-748)	pFJNm-601	Inserto y Vector: <i>SphI/BamHI</i>	F:309/R:284	pFJNm-194
Sirt1-AB (1-364)	pFJNm-611	Inserto y Vector: <i>SphI/BamHI</i>	F:285/R:308	pFJNm-194
Sirt1-BC (197-543)	pFJNm-612	Inserto y Vector: <i>SphI/BamHI</i>	F:305/R:310	pFJNm-194
Sirt1-CD (364-748)	pFJNm-602	Inserto y Vector: <i>SphI/BamHI</i>	F:307/R:284	pFJNm-194

Tabla 10. Clonaciones realizadas en el vector pQE-70. Se indica el DNA clonado, número identificativo, comentarios de clonación, primers usados y el plásmido origen de la clonación.

- **pEGFP-C1:** Plásmido comercial de la casa Clontech de 4,7 Kb que codifica un red-shifted variant del GFP silvestre que ha sido optimizado para emitir una fluorescencia más brillante y tener una mayor expresión en células mamíferas. Contiene un amplio polilinker con los puntos de corte de las siguientes enzimas de restricción: *BspEI*, *BglII*, *XhoI*, *CacI*, *HindIII*, *EcoRI*, *PstI*, *Sall*, *KpnI*, *SacII*, *ApaI*, *SmaI*, *BamHI*, *XbaI* y *BclI*. Los fragmentos de DNA clonados en dicho polilinker se expresan

como una proteína fusionada al extremo carboxilo terminal de EGFP. Contiene un casete de resistencia a neomicina (*Neo^R*) que consiste en el promotor temprano SV40, el gen de resistencia a kanamicina/neomicina de Tn5 y señales de poliadenilación de la timidina quinasa del virus del Herpes simplex (HSV TK), permitiendo la transfección estable en células eucarióticas por la selección con G418 (Gentamicina). Además, aguas arriba contiene un promotor bacteriano que expresa la resistencia a kanamicina (*Kan^R*) en *E. coli* que permite su selección en bacterias. En este trabajo se ha usado para la expresión de Sirt1 fusionada a GFP. El DNA de Sirt1 se amplificó por PCR y se clonó utilizando las enzimas de restricción indicadas en la tabla 11.

DNA	NÚMERO IDENTIFICATIVO	COMENTARIOS	PRIMERS USADOS (Nº)	PLÁSMIDO ORIGEN
Sirt1	pFJNm-561	Inserto y Vector: <i>Sall/BamHI</i>	F:311/R:312	pFJNm-194

Tabla 11. Clonación realizada en el vector pEGFP-C1. Se indica el DNA clonado, número identificativo, comentarios de clonación, primers usados y el plásmido origen de la clonación.

- **pTER:** plásmido de 5 Kb usado para la inserción de siRNAs (151). El polilinker contiene los puntos de corte de las siguientes enzimas de restricción: *BglII*, *HindIII*, *Asp718I*, *KpnI*, *BamHI*, *BstXI*, *EcoRI*, *PstI*, *EcoRV*, *NotI*, *XhoI*, *XbaI*, *ApaI* y *PmeI*. Este plásmido consiste en un promotor H1 y un operador de tetraciclina (TO) seguido de la secuencia codificante del siRNA. En ausencia del represor de tetraciclina (TR) este plásmido se expresa constitutivamente. En líneas celulares donde el TR está transfectado establemente, éste se une al TO bloqueando la transcripción dependiente del promotor H1. La adición de doxiciclina (2 µg/ml) al medio desplaza el TR del TO permitiendo la expresión del siRNA. Este vector contiene un gen de resistencia a ampicilina (*Amp^R*) para su selección en bacterias y un gen de resistencia a zeocina (*Ble^R*) para su selección en células eucarióticas. En este trabajo se ha usado para la expresión de los siRNAs detallados en la tabla 12.

DNA	Nº IDENTIFICATIVO	COMENTARIOS
siRNA1 anti Sirt1	pFJNm-258	Clonación del plásmido detallada a continuación de la tabla. Vector digerido con <i>BglIII/HindIII</i>
siRNA2 anti Sirt1	pFJNm-259	Clonación del plásmido detallada a continuación de la tabla. Vector digerido con <i>BglIII/HindIII</i>

Tabla 12. Clonaciones realizadas en el vector pTER. Se indica el DNA clonado, número identificativo y comentarios de clonación.

Para el diseño de los siRNA que se van a clonar en el plásmido pTER se siguieron los criterios generales de diseño de siRNAs (152, 153). En resumen, un siRNA debe estar compuesto de dos cadenas complementarias (sentido y antisentido) con 2-3 nucleótidos sobresalientes en el extremo 3'. Para que el siRNA sea efectivo la secuencia debe:

- Estar localizada entre los 50-100 primeros nucleótidos después del ATG.
- Tener 21 nucleótidos de longitud donde los dos primeros son AA: AA (19N) ó N21. A= adenina, N= cualquier nucleótido.
- Tener un contenido G/C entre 30-50%.
- Evitar las zonas 5' y 3' UTR y las secuencias que comparten cierto grado de homología con otros genes.
- Evitar zonas con más de 4 timinas o adeninas debido a que de 4-6 nucleótidos poliT actúa como una señal de terminación para la RNA polimerasa III.

Para la búsqueda y elección de las potenciales secuencias diana del siRNA nos basamos en los criterios mencionados anteriormente y se utilizó el "siRNA target finder" de la página web de Ambion (154). Aquí copiamos la secuencia de mRNA de la proteína que se pretende eliminar y el programa busca en la secuencia las potenciales dianas. El programa te indica la posición del dinucleótido AA, los 21 nucleótidos diana y el correspondiente oligonucleótido sentido y antisentido. Se seleccionaron cuatro secuencias diana diferentes.

Para poder ser clonados en el plásmido pTER los siRNAs elegidos, se diseñaron dos oligonucleótidos de DNA que codifican el siRNA elegido (oligo1 y oligo2 de la tabla 13). La mayoría de los diseños de los oligonucleótidos de DNA constan de 19

nucleótidos sentido unidos a su secuencia antiparalela por un pequeño espaciador y terminan en 5 ó 6 residuos de timina que sirven como sitio de terminación de la transcripción. Como espaciador se utilizó la secuencia recomendada por Ambion: TTCAAGAGA. Para clonar el oligonucleótido de DNA en el plásmido pTER, se añadieron a los extremos 5' y 3' los puntos de corte de *Bam*HI y *Hind*III (Figura 19 A). Ese diseño produce un transcrito de RNA que se dobla en un “short hairpin siRNA” (Figura 19 B).

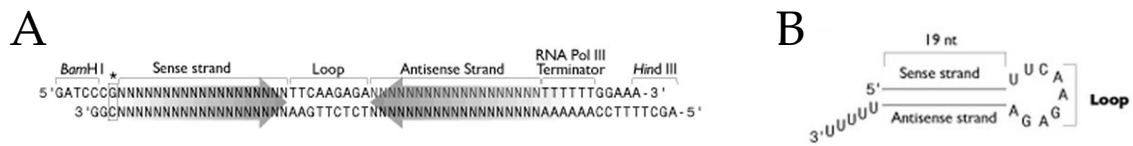


Figura 19. Diseño del siRNA. A. Oligonucleótido de DNA diseñado para su inserción en el plásmido pTER. B. Estructura secundaria del siRNA. Sense strand: cadena sentido. Antisense strand: cadena antisentido. Loop: secuencia espaciadora. RNA Pol II terminator: secuencia terminadora para la transcripción. nt: nucleótidos. Figuras tomadas de la página web de Ambion (152)

De las cuatro secuencias elegidas, las dos que fueron más efectivas en la eliminación de Sirt1 se detallan en la tabla 13.

NOMBRE	POSICIÓN EN LA SECUENCIA DIANA	SECUENCIA
siRNA1(127)	1288	Oligo1: gatccccGATGAAGTTGACCTCCTCAAttcaagagaTGAGGAGGTCAACT TCATCtttttgaaa Oligo2: agctttccaaaaGATGAAGTTGACCTCCTCAAtctctgaaTGAGGAGGTC AACTTCATCggg
siRNA2	433	Oligo1: gatccccCCTTCTGTTGCGGTGATGAAttcaagagaTTCATCACCGAACAG AAGGtttttgaaa Oligo2: agctttccaaaaCCTTCTGTTGCGGTGATGAAtctctgaaTTCATCACCGA ACAGAAGGggg

Tabla 13. siRNAs diseñados en este trabajo. Se indica el nombre, posición en la secuencia diana y secuencia.

Para la clonación de estos oligonucleótidos antisentido (siRNA1 y siRNA2) en el plásmido pTER, es necesario alinear cada pareja de oligonucleótidos (oligo1 y oligo2, tabla 13) para formar el oligonucleótido de doble cadena de la figura 19 A. La alineación se realiza en un termobloque a 100 °C durante 5 minutos. En la alineación de estos oligonucleótidos se genera un fragmento de DNA de doble cadena con un extremo protuberante en cada lado que contiene la semisequencia de las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII* (Figura 19 A). Tras la incubación, se deja enfriar hasta que llegue a 50 °C. Finalmente, se adiciona un fosfato al extremo 5' de cada pareja de oligonucleótidos incubándolos con T4 polinucleótido quinasa durante 1 hora a 37 °C. A continuación, se ligan el siRNA de doble cadena preparado y el vector digerido previamente con *BglIII* y *HindIII*. La ligación del siRNA en el plásmido pTER con los puntos de restricción de las enzimas *BglIII* y *BamHI* es posible ya que comparten el mismo núcleo de cuatro nucleótidos cuando ambos puntos son cortados por las enzimas de restricción.

- **pTER-GFP:** plásmido pTER donde se ha insertado la secuencia de la proteína verde fluorescente (GFP) del plásmido pEGFP-C1 junto con su promotor *CMV* aguas abajo de la secuencia del siRNA. Se utiliza para la expresión simultánea del siRNA y la proteína GFP. En este trabajo se ha utilizado para la expresión simultánea de los distintos siRNAs contra Sirt1 y la proteína GFP (Tabla 14). Para ello, se llevó a cabo la clonación por PCR del fragmento de la proteína verde fluorescente más su promotor en el vector pTER-siRNA1 y pTER-siRNA2 utilizando los primers detallados en la tabla 14.

DNA	NÚMERO IDENTIFICATIVO	COMENTARIOS	PRIMERS USADOS (Nº)	PLÁSMIDO ORIGEN
siRNA1	pFJNm-366	Inserto: No enzima / Vector: <i>EcoRV</i> (romo).	F: 148/R:149	pFJNm-258
siRNA2	pFJNm-368	Inserto: No enzima / Vector: <i>EcoRV</i> (romo).	F: 148/R:149	pFJNm-259

Tabla 14. Clonaciones realizadas en el vector pTER-GFP. Se indica el DNA clonado, número identificativo, comentarios de clonación, primers usados y plásmido origen de la clonación.

- **pRL-TK:** Plásmido comercial de la casa PROMEGA que se usa como un control interno para la normalización de la transfección para ensayos luciferasa. Este vector provee de una expresión constitutiva de Renilla Luciferasa (Rluc), lo que provee un valor interno control que normaliza el experimento de transfección con luciferasa firefly. Número identificativo: pFJNm-227.
- **pGL3-luc:** Plásmido comercial de la casa Promega que codifica el gen de luciferasa firefly modificado. En este trabajo se han utilizado dos plásmidos que han sido cedidos por la Dra. Carline Hill (Cancer Research UK) (Tabla 15).

DNA	NÚMERO IDENTIFICATIVO	COMENTARIOS
DE-Luc	pFJNm-334	Clonada la secuencia del elemento regulador del promotor del gen <i>goosecoid</i> de <i>Xenopus laevis</i> (21, 66, 68, 155)
ARE-Luc	pFJNm-337	Clonada la secuencia del elemento regulador del promotor del gen <i>Mix.2</i> de <i>Xenopus laevis</i> (21, 64-66)

Tabla 15. Plásmidos clonados en el vector pGL3-luc utilizados en este trabajo. Se indica el DNA clonado, número identificativo, comentarios del inserto clonado en el vector.

- **pCR[®]2.1-TOPO[®]:** Plásmido de 3,9 Kb que provee el kit TOPO TA Cloning[®] de Invitrogen, utilizado como plásmido transitorio de clonación para las diferentes construcciones realizadas en este trabajo. Dicho plásmido se provee linearizado con un residuo de timina sobresaliente en la posición 3' para facilitar la clonación del producto de PCR que contiene un residuo de adenina sobresaliente en su posición 3'.

II.3. Cultivo celular.

II.3.1 Líneas celulares.

Las líneas celulares usadas en este trabajo son las siguientes:

- HaCaT: línea celular de queratinocitos humanos espontáneamente inmortalizados (156).

- HEK293T: línea celular embrionaria humana derivada de riñón (157).
- Hep3B: línea celular humana proveniente de hepatoma (55).
- NIH3T3: línea celular de fibroblastos de ratón (21).
- HaCaT-GFP-Smad2: línea celular HaCaT transfectada establemente con GFP-Smad2 (20).

Las líneas celulares fueron crecidas en un incubador HERAcell® 150 en las condiciones de 37 °C de temperatura y concentración de CO₂ al 7,5%.

II.3.2 Medios de cultivo.

Los medios de cultivo utilizados en este trabajo son:

- DMEM: 4,5 g/l de glucosa sin L-Glutamina. Testado para hibridoma (LONZA). Medio de cultivo usado para la línea celular HaCaT, HEK293T, NIH3T3 y HaCaT-GFP-Smad2. En el caso de la línea celular HaCaT-GFP-Smad2 y la línea HaCaT transfectada transitoriamente con Sirt1GFP, el medio es suplementado con 0,5 mg/ml de G418, antibiótico que selecciona las células que contienen plásmidos para la expresión de proteínas de fusión con GFP.
- EMEM: MEM Eagle-EBBS con aminoácidos no esenciales y con L-Glutamina. Medio de cultivo usado para la línea celular Hep3B.

Ambos medios son suplementados con: Suero Bovino Fetal al 10% (v/v) (GIBCO); L-Glutamina al 1% (v/v) (LONZA); Penicilina/Estreptomina al 1% (v/v) (LONZA).

Para la separación de las células de los frascos/placas de cultivo se utilizó Tripsina-EDTA (SIGMA ALDRICH).

II.4. Reactivos y enzimas.

Durante la realización de este trabajo se han utilizado los siguientes reactivos y enzimas (Tabla 16):

NOMBRE	CASA COMERCIAL	CONCENTRACIÓN
TGFβ1	PEPROTECH	2 ng/ml
SB-431542	SIGMA ALDRICH	10 μM
Tricostatina A (TSA)	SIGMA ALDRICH	2,5 μM
Proteína λ Fosfatasa	NEW ENGLAND BIOLABS	400 U
Resveratrol	SIGMA ALDRICH	30 μM
IPTG	SIGMA ALDRICH	0,5 y 1 μM
EX527	SIGMA ALDRICH	1 μM
HR73	SIGMA ALDRICH	1 μM
Gentamicina (G418)	ACROS ORGANICS	0,5 mg/ml

Tabla 16. Reactivos y enzimas utilizados en este trabajo. Se indica nombre, casa comercial y concentración utilizada.

II.5. Métodos generales relativos al estudio de ácidos nucleicos.

II.5.1 Extracción de ácidos nucleicos.

II.5.1.1 DNA.

En este trabajo se han utilizado 5 métodos distintos de extracción de DNA plasmídico bacteriano. Dichos métodos se detallan a continuación:

1. Lisis alcalina con dodecil sulfato sódico (SDS). Este método se ha llevado a cabo siguiendo el protocolo previamente descrito (158).

Soluciones utilizadas en este protocolo:

- **Solución I:** 50 mM Glucosa; 20 mM Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA (pH 8,0).
 - **Solución II:** 0,2 N NaOH; SDS al 1% (p/v) (ACROS ORGANICS).
 - **Solución III:** 3 M Acetato potásico (ACROS ORGANICS); Ácido acético glacial al 11% (v/v) (PANREAC).
2. QIAprep Spin Miniprep Kit: kit de QIAGEN utilizado para la extracción de hasta 20 μg de DNA plasmídico. El protocolo se realizó según instrucciones del fabricante.

3. QIAGEN Plasmid Midi Kit: kit de QIAGEN utilizado para la extracción de hasta 100 μ g de DNA plasmídico. El protocolo se realizó según instrucciones del fabricante.

4. QIAGEN Plasmid Maxi Kit: kit de QIAGEN utilizado para la extracción de hasta 500 μ g de DNA plasmídico. El protocolo se realizó según instrucciones del fabricante.

Al finalizar cualquiera de estos cuatro protocolos se cuantifica el DNA extraído con el espectrofotómetro Nanodrop 1000.

II.5.1.2 RNA.

Para la extracción de RNA de células eucarióticas se ha usado el kit de QIAGEN RNeasy® Mini Kit que permite la extracción de hasta 100 μ g de RNA total. Brevemente, se lisan las células en 350 μ l de buffer de lisis RLT (suministrado por el kit) suplementado con β -mercaptoetanol puro (1:100). Seguidamente, se sonica la muestra durante 5 segundos al mínimo de potencia con el sonicador Sonopuls (Bandelin). A continuación, se extrae el RNA total de la muestra con el purificador automático de ácidos nucleicos de QIAGEN llamado QIAcube utilizando el protocolo de purificación de RNA total que incluye digestión con DNase (DNase libre de RNase, de QIAGEN). Finalmente, se cuantifica el RNA extraído con el espectrofotómetro Nanodrop 1000.

II.5.1.3 Precipitación de ácidos nucleicos por etanol. Extracción de ácidos nucleicos por el método fenol/cloroformo.

La precipitación de DNA/RNA por este método se realiza siguiendo el protocolo que se detalla a continuación. Se añade a la solución que contiene el DNA dos volúmenes de etanol frío 100% (Prolabo), se mezcla vigorosamente y se incuba a -20 °C durante toda la noche. Tras la incubación, se centrifuga a máxima velocidad durante 20 minutos a 4 °C y se lava el pellet de DNA con 1 ml de etanol 70% (v/v). Después de centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos a 4 °C, se deja secar el pellet. Finalmente, dicho pellet se resuspende en agua.

La extracción de ácidos nucleicos por el método fenol cloroformo se ha llevado a cabo tal y como está descrito previamente (159).

II.5.2 Retrotranscripción.

La retrotranscripción o transcripción inversa es un proceso por el cual se sintetiza una cadena copia de DNA a partir de RNA de cadena simple. La reacción de retrotranscripción se realizó con el kit de BIORAD iScript cDNA synthesis Kit según indicaciones del fabricante. Al finalizar la reacción de retrotranscripción, el volumen se lleva a 200 μ l con agua ultra pura para su posterior uso para la PCR cuantitativa.

II.5.3 PCR cuantitativa o qPCR.

Para la realización de las qPCR realizadas en este trabajo, se han utilizado dos tipos de primers:

- Primers diseñados con el programa de diseño de primers "Primer 3" (160) (Tabla 17):

NOMBRE	SECUENCIA
GAPDH F	ACCACAGTCCATGCCATCAC
GAPDH R	TCCACCACCCTGTTGCTGTA
SERPINE1 F	GCAGGACATCCGGGAGAGA
SERPINE1 R	CCAATAGCCTTGGCCTGAGA
JUNB F	CAGTCCAGACACACAAACC
JUNB R	CTGTGTCCATGTGTGACAGT
ID1 F	TAAGGTGACCCTTGCTCA
ID1 R	GTCTAGCTAGTCCCGTGCT
HPRT1 F	TGTTTGGGCTATTTACTAGTTG
HPRT1 R	ATAAAATGACTTAAGCCCAGAG

Tabla 17. Primers diseñados con el programa Primer3 utilizados en este trabajo. Se indica tanto el nombre como la secuencia del primer.

Para estos primers la mezcla de PCR realizada es la siguiente:

- SYBR® Premix Ex Taq™ (TAKARA) 12,5 µl
- Mezcla primers F+R (10 µM) 1 µl
- Agua ultra pura 6,5 µl
- cDNA 5 µl

- Primers QuantiTect® de la casa QIAGEN (Tabla 18):

NOMBRE	CÓDIGO
CCDC34	QT00024024
CITED4	QT00221172
HOXC9	QT00093898
TMEM238	QT00238070
SNRNP35	QT01681162
CFL2	QT01670179
HUS1	QT00025165
INSIG2	QT01674337
MKL2	QT00010115
TMEM41A	QT00096992

Tabla 18. Primers QuantiTect® utilizados en este trabajo. Se indica tanto el nombre como el código de la casa QIAGEN.

Para estos primers la mezcla de PCR realizada es la siguiente:

- SYBR® Premix Ex Taq™ (TAKARA) 12,5 µl
- Primer QuantiTech (10X) 2,5 µl
- Agua ultra pura 5 µl
- cDNA 5 µl

En todos los casos, las PCRs a tiempo real se realizaron con el termociclador de BIORAD IQ™5 Multicolor Real-Time PCR Detection System y el programa de Bio-Rad IQ5.

La representación de los datos de qPCR para expresión de genes se representa como Expresión Relativa, que es la normalización de la expresión del gen a analizar

con respecto a la expresión del gen control, GAPDH, y respecto a una muestra control, típicamente el tiempo 0.

II.6. Métodos generales relativos al estudio de proteínas.

II.6.1 Transfección de células eucarióticas.

La transfección consiste en la introducción de material genético externo en células eucarióticas. En este trabajo se han utilizado dos agentes transfectantes: Lipofectamine™ y FuGENE® HD.

- Protocolo de transfección general con Lipofectamine™.

Este protocolo se ha utilizado para las líneas celulares HEK293T, Hep3B y NIH3T3. Se siembran 21.000 células por cm² para obtener un cultivo al día siguiente de aproximadamente un 70% de confluencia. Para el conteo de las células se usó el TC10™ Automated Cell Counter de BIORAD.

Para cada DNA que queremos introducir se preparan dos soluciones distintas (los datos que se muestran son para transfecciones en placas de 10 cm de diámetro):

- Solución A: 650 µl de medio Opti-MEM® (GIBCO) + X µg de DNA (Tabla 19).
- Solución B: 650 µl de medio Opti-MEM® + X µl Lipofectamine™ (Invitrogen) (Tabla 19).

LÍNEA CELULAR	µg DNA	µl LIPOFECTAMINE™
HEK293T	6,5	33
Hep3B	9,8	33
NIH3T3	9,8	33

Tabla 19. Valores para la transfección óptima con Lipofectamine™ de las diferentes líneas celulares. Se indican los µg de DNA y µl de Lipofectamine™ necesarios para la transfección óptima de cada una de las tres líneas celulares en una placa de 10 cm de diámetro.

Cada una de las soluciones se mezclan por separado y finalmente entre sí. Posteriormente, la mezcla se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Por

otro lado, se aspira el medio del cultivo celular, se lava con medio Opti-MEM® y se añaden 4 ml de medio Opti-MEM®. Tras la incubación, la mezcla se añade al cultivo gota a gota y se incuba durante 5 horas a 37 °C y 7,5% de CO₂. Finalmente, se aspira el medio Opti-MEM®, se lava concienzudamente para no dejar ningún resto de Lipofectamine™ y se dejan las células creciendo en el incubador. Antes de la realización del ensayo, las células se incuban de 24 a 48 horas.

Para todas las transfecciones realizadas en la línea celular HEK293T que llevan asociadas una estimulación con TGFβ, se protocolizó un procedimiento mediante el cual se eliminan los niveles elevados de fosforilación de Smad2 en condiciones de no tratamiento con TGFβ presentes en esta línea celular (Figura 20 A) (161). Una vez transfectadas las células, se tratan durante toda la noche con 10 μM del inhibidor del receptor tipo I de TGFβ (ALK5), SB-431542. Tras el tratamiento, se realizan dos lavados con PBS 1X (GIBCO) y posteriormente se añade medio DMEM con 0,5% Suero Bovino Fetal, lo que permite la reactivación de los receptores de TGFβ para poder señalar de nuevo (161, 162). Finalmente, las células son inducidas o no con 2 ng/ml de TGFβ. SB-431542 es nuevamente añadido a las muestras que no son inducidas con TGFβ. Este

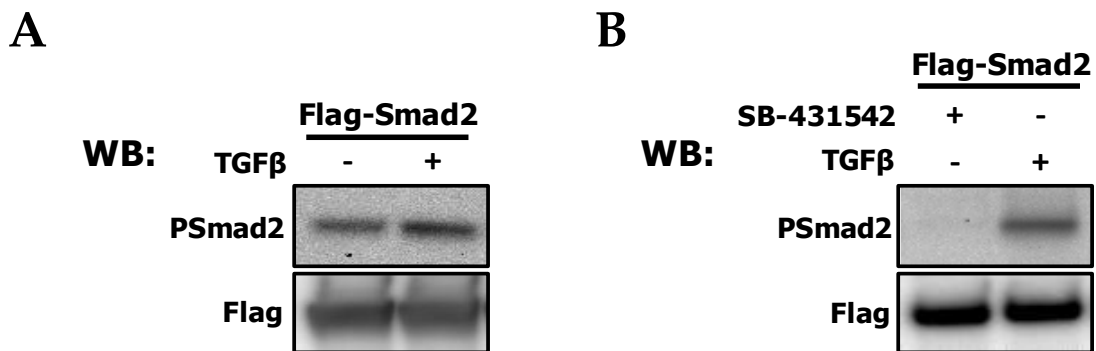


Figura 20. SB-431542 impide la señalización autocrina de TGFβ en células HEK293T. A. Células HEK293T fueron transfectadas con Flag-Smad2. Al día siguiente las células fueron inducidas o no con 2 ng/ml de TGFβ durante 1 hora. La fosforilación y la presencia de Smad2 fueron detectadas por Western Blot. B. Células HEK293T fueron transfectadas con Flag-Smad2. Tras la transfección, las células fueron tratadas con 10 μM SB-431542 durante toda la noche. Al día siguiente el inhibidor fue lavado y posteriormente fueron inducidas o no con 2 ng/ml de TGFβ durante 1 hora. SB-431542 fue añadido a las muestras no inducidas con TGFβ. La fosforilación y la presencia de Smad2 fueron detectadas por Western Blot. WB: Western Blot.

procedimiento consigue el bloqueo de la señalización de TGF β y elimina la fosforilación basal de Smad2 presente en células HEK293T (Figura 20 B). El lavado con PBS de las muestras tratadas con SB-431542 permite la señalización de TGF β (Figura 20 B). Con este procedimiento nos aseguramos de que las muestras no inducidas con TGF β no presenten señalización debido a la producción autocrina de TGF β en células HEK293T.

- Protocolo de transfección general con FuGENE[®] HD.

Este protocolo se ha utilizado para transfectar la línea celular HaCaT. Se siembran 45.000 células por cm² para obtener un cultivo al día siguiente de aproximadamente un 70% de confluencia. Para el conteo de las células se usó el TC10[™] Automated Cell Counter de BIORAD.

Para cada DNA que queremos introducir se prepara una solución compuesta por 500 μ l de medio Opti-MEM[®] (GIBCO) + 13 μ g de DNA (los datos que se muestran es para transfecciones en placas de 10 cm de diámetro). Tras mezclar esta solución se añaden 40 μ l de FuGENE[®] HD (PROMEGA) y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añade la mezcla sobre el medio de cultivo de las células. Antes de la realización del experimento, las células se cultivan de 24 a 48 horas.

II.6.2 Obtención de extractos proteicos en células eucarióticas.

II.6.2.1 Extractos crudos totales.

Para la obtención de extractos crudos totales de células eucariotas, se aspira el medio de cultivo y se lava 2 veces con PBS 1X. Posteriormente, se añaden 500 μ l de Buffer de Lisis Total a una placa de 10 cm de diámetro y se recogen las células con una espátula de silicona. El lisado obtenido se incuba durante 20 minutos en hielo y se centrifuga a máxima velocidad 10 minutos a 4 °C. Finalmente, se recoge el sobrenadante que corresponde al extracto proteico total.

Solución utilizada en este protocolo:

- **Buffer de Lisis Total:** 50 mM HEPES pH 7,2 (SIGMA ALDRICH); 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1,2 mM MgCl₂; Triton X-100 al 1% (v/v) (SIGMA ALDRICH); Glicerol al 10% (v/v) (Química Clínica Aplicada S.A.). Autoclavar. Añadir fresco: 1 mM DTT (SIGMA ALDRICH); Inhibidor de proteasas (1:100) (SIGMA ALDRICH); Cocktail de inhibidores de fosfatasa I (1:100) (SIGMA ALDRICH); Cocktail de inhibidores de fosfatasa II (1:100) (SIGMA ALDRICH); 10 mM Butirato de Sodio (SIGMA ALDRICH); 25 mM NaF (SIGMA ALDRICH); 25 mM β-glicerolfosfato (SIGMA ALDRICH).

II.6.2.2 Extractos nucleares.

La obtención de extractos nucleares se realizó siguiendo el protocolo descrito previamente (163). Brevemente, se aspira el medio de cultivo y se lava 2 veces con PBS 1X. Se añaden 5 ml del Buffer Hipotónico 10 mM NaCl (para placas de 10 cm de diámetro) y se incuba 5 minutos en hielo. Posteriormente, se recogen las células con una espátula de silicona. El lisado obtenido se centrifuga durante 10 minutos a 500 rpm a 4 °C, se desecha el sobrenadante y se añade 5 veces el volumen de pellet de Buffer 500 mM NaCl. Posteriormente, se incuba durante 20 minutos a 4 °C con rotación constante y se centrifuga a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Finalmente, se recoge el sobrenadante que corresponde al extracto nuclear y se diluye a 150 mM de NaCl con el Buffer 0 mM NaCl.

Soluciones utilizadas en este protocolo:

- **Buffer Hipotónico 10 mM NaCl:** 20 mM HEPES (pH 7,6); Glicerol al 20% (v/v); 10 mM NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM EDTA; Triton X-100 al 0,1% (v/v). Autoclavar. Añadir fresco: 1 mM DTT; Inhibidor de proteasas (1:1.000); Cocktail de inhibidor de fosfatasa I y II (1:1.000); 10 mM Butirato de Sodio; 25 mM NaF; 25 mM β-glicerolfosfato.
- **Buffer 500 mM NaCl:** 20 mM HEPES (pH 7,6); Glicerol al 20% (v/v); 500 mM NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM EDTA; Triton X-100 al 0,1% (v/v). Autoclavar.

Añadir fresco: 1 mM DTT; Inhibidor de proteasas (1:100); Cocktail de inhibidor de fosfatasa I y II (1:100); 10 mM Butirato de Sodio; 25 mM NaF; 25 mM β -glicerolfosfato.

- **Buffer 0 mM NaCl:** 20 mM HEPES (pH 7,6); Glicerol al 20% (v/v); 1,5 mM $MgCl_2$; 0,2 mM EDTA; Triton X-100 al 0,1% (v/v). Añadir fresco: 1 mM DTT; Inhibidor de proteasas (1:100); Cocktail de inhibidor de fosfatasa I y II (1:100); 10 mM Butirato de Sodio; 25 mM NaF; 25 mM β -glicerolfosfato.

II.6.3 Western Blot.

El Western Blot es una técnica analítica usada para detectar y cuantificar proteínas específicas en una muestra proteica determinada.

En primer lugar, el extracto proteico se prepara con tampón de carga a una concentración final de 1X y se calienta durante 3 minutos a 100 °C. Los geles usados en este trabajo para cargar el extracto proteico son de poliacrilamida 10% Bis-Tris (Criterion™ XT Precast Gel de BIORAD). Por cada calle del gel se cargan aproximadamente 50 μ g de proteína. El gel se corre durante 35 minutos a un voltaje de 200 V en un buffer llamado XT MES Running Buffer (BIORAD). Una vez terminada la electroforesis, se transfiere a una membrana de PVDF (GE HEALTHCARE) mediante una transferencia en semiseco durante 2 horas (TE77, ECL Semi-Dry Transfer Unit). Para la transferencia se usa el Buffer de Transferencia.

Una vez transferido el gel a la membrana, se bloquea con la Solución de Bloqueo apropiada durante media hora (Tabla 20). Tras el bloqueo, la membrana se incuba durante 2 horas con una dilución del anticuerpo primario a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4 °C (Tabla 20). Posteriormente, se lava 3 veces con Buffer TBST y se incuba con una dilución del anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente (Tabla 21). Al finalizar la incubación se lava la membrana 3 veces con TBST.

Finalmente, la membrana se incuba con Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagent (GE HEALTHCARE) siguiendo las instrucciones del fabricante y se

adquieren las imágenes del Western Blot con en el adquisidor de imágenes “Molecular Imager ChemiDoc XRS System” de BIORAD que detecta la quimioluminiscencia del anticuerpo secundario. Para señales de quimioluminiscencia débiles se usó SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific).

La cuantificación de los niveles de proteína de los Western Blot se realizó con el programa de BIORAD Quantity One. Los valores se representan con respecto a los valores de la proteína control y son normalizados con el valor medio de la inmunoprecipitación control en el caso de existir ese valor.

NOMBRE	CASA COMERCIAL	NÚMERO CATÁLOGO	DILUCIÓN	BLOQUEANTE	INCUBACIÓN
Smad2/3	BD BIOSCIENCE™	610842	1/1.000	BSA	2 horas
Smad4	STA. CRUZ	SC-7966	1/1.000	BSA	2 horas
P-Smad2	CELL SIGNALLING	#3101L	1/500	Leche	2 horas
P-Smad3	CELL SIGNALLING	9520	1/500	Leche	2 horas
Flag M2	SIGMA ALDRICH	F-1804	1/1.000	BSA	2 horas
HA-HRP	ROCHE	2013819	1/1.000	BSA	2 horas
Myc	STA. CRUZ	SC-40	1/1.000	BSA	2 horas
Sirt1	MILLIPORE	05-1243	1/1.000	BSA	2 horas
Acetil-Lys	CELL SIGNALLING	9681	1/500	BSA	Toda la noche
pentaHis	QIAGEN	34660	1/2.000	BSA	2 horas
GST	STA. CRUZ	SC-57753	1/1.000	BSA	2 horas
B-actina	SIGMA ALDRICH	A-5441	1/4.000	BSA	2 horas

Tabla 20. Anticuerpos primarios utilizados en Western Blot. Se indica nombre del anticuerpo, casa comercial, número de catálogo, dilución usada, solución bloqueante y tiempo de incubación.

NOMBRE	CASA COMERCIAL	NÚMERO CATÁLOGO	DILUCIÓN	BLOQUEANTE	INCUBACIÓN
Anti IgG de ratón	BD Pharmigen™	559626	1/2.000	Mismo que primario	1 hora
Anti IgG de conejo	GE HEALTHCARE	NA9340	1/1.000	Mismo que primario	1 hora
Anti IgG de ratón (TRUEBLOT™)	eBIOSCIENCE	18-8817-33	1/1.000	Mismo que primario	1 hora

Tabla 21. Anticuerpos secundarios utilizados en Western Blot. Se indica nombre del anticuerpo, casa comercial, número de catálogo, dilución usada, solución bloqueante y tiempo de incubación.

Soluciones utilizadas en este protocolo:

- **Tampón de carga (4X) (50 ml):** 10 ml Tris-HCl pH 6,8; 25 ml glicerol; 7,5 ml β -mercaptoetanol puro; 1,2 g SDS; 1,8 mg Bromofenol blue; 7,5 ml agua.
- **Buffer TBST:** 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; Tween 20 al 0,1% (v/v).
- **Buffer de transferencia:** 2,9 g Glicina; 5,8 g Trizma base; 0,3 g SDS en 800 ml de agua. En el momento del uso añadir metanol al 20% (v/v).
- **Solución de Bloqueo:** solución de leche al 5% (p/v) (BD BISCIENCE) o albúmina (BSA) al 5% (p/v) (STA. CRUZ) en TBST. La elección de leche o BSA es según el anticuerpo que se vaya a añadir posteriormente (ver tabla 20).

II.6.4 Tinción de Coomassie.

La tinción de Coomassie es una técnica usada para la tinción de proteínas de manera general en una muestra determinada.

En primer lugar, la muestra proteica previamente preparada se carga en un gel de poliacrilamida tal y como se ha descrito en el protocolo para Western Blot (ver apartado II.6.3). Una vez finalizada la electroforesis, se sumerge el gel en una solución de Tinción de Coomassie y se incuba durante 1-2 horas. Al finalizar la incubación se elimina la solución anterior y se lava el gel varias veces con la Solución Decolorante hasta que se vean las bandas con claridad. Finalmente, se adquiere la imagen con el adquirente de imágenes "Molecular Imager ChemiDoc XRS System" de BIORAD.

Soluciones utilizadas en este protocolo:

- **Solución de Tinción de Coomassie (1 litro):** 2,5 gr Coomassie Brilliant Blue C-250 (AMRESCO®); 450 ml Metanol (Química Clínica Aplicada S.A.); 450 ml agua; 100 ml Acido Acético glacial (PANREAC).
- **Solución Decolorante (1 litro):** 450 ml Metanol; 450 ml agua; 100 ml Acido Acético glacial.

II.6.5 Inmunoprecipitación.

La inmunoprecipitación es una técnica usada para precipitar una proteína concreta de un extracto proteico usando un anticuerpo específico. Utilizando esta técnica se pueden realizar análisis de las modificaciones covalentes presentes en una proteína como fosforilación y acetilación, y también análisis de interacción de dos o más proteínas en un extracto celular. En este último caso, la técnica se llama co-inmunoprecipitación.

Para realizar esta técnica, una vez obtenido el extracto proteico como se indica en el apartado II.6.2, se prepara la cantidad que queramos inmunoprecipitar, se añaden 500 ng de anticuerpo por 400 µg de proteína del extracto celular y se incuba durante 1-2 horas a 4 °C con rotación constante (Tabla 22).

Para la inmunoprecipitación, se utiliza una resina de sefarosa que tiene acoplada covalentemente la proteína A y otra que tiene acoplada covalentemente la proteína G (GE HEALTHCARE BIOSCIENCE). Las proteínas A y G se caracterizan porque se unen a la región Fc del la IgG de una gran variedad de especies animales (164). Para cada muestra que se va a inmunoprecipitar se mezclan 8 µl de la solución 50/50 (resina/buffer) de Proteína Sefarosa A con 8 µl de la solución 50/50 (resina/buffer) de Proteína Sefarosa G, se lavan 3 veces con el Buffer de Lisis Total (ver apartado II.6.2.1) sin inhibidores y se bloquea la resina con BSA al 1% (p/v). Se incuba la resina en esas condiciones durante 30 minutos a 4 °C con rotación constante. Tras la incubación, se lava 3 veces con el mismo buffer con el fin de eliminar el BSA libre y se resuspende en tanto Buffer de Lisis Total como sea necesario para repartir 50 µl de resina a cada tubo que se va a inmunoprecipitar.

Una vez concluida la incubación del extracto proteico con el anticuerpo, se añaden 50 µl de la resina previamente preparada a cada tubo y se incuba una hora a 4 °C con rotación constante. Finalmente, se lava la resina 3 veces con Buffer de Lisis Total. Para la visualización del resultado de la inmunoprecipitación se realiza el protocolo de Western Blot desarrollado en el apartado II.6.3.

En el caso concreto de querer eluir las proteínas fusionadas a Flag inmunoprecipitadas, los últimos lavados de la inmunoprecipitación se realizan con el buffer WB100. A continuación, se aspira el sobrenadante y se añade sobre la resina 50 µl de una solución con 400 µg/ml del péptido competitivo en el buffer WB100. Se mezcla concienzudamente y se deja incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Al finalizar la incubación, se vuelve a mezclar y se centrifuga para posteriormente recuperar los 50 µl de eluido. La elución se realiza 3 veces. En nuestro trabajo se utilizó el péptido FLAG® peptide (SIGMA ALDRICH).

Solución utilizada en este protocolo:

- **Buffer WB100:** 20 mM HEPES; 100 mM KCl (SIGMA ALDRICH); 0,5 mM EDTA; Glicerol al 10% (v/v).

NOMBRE	CASA COMERCIAL	NÚMERO CATÁLOGO
Flag M2	SIGMA ALDRICH	F-1804
Smad2 (cabra)	STA.CRUZ	SC-6200
Smad2/3	BD BIOSCIENCE™	610842
ChromPure Mouse IgG Whole molecule (IgG de ratón no inmunizado)	Jackson InmunoResearch	015-000-003
ChromPure Mouse IgG Whole molecule (IgG de cabra no inmunizada)	Jackson InmunoResearch	005-000-003

Tabla 22. Anticuerpos utilizados en inmunoprecipitación. Se indica el nombre del anticuerpo, la casa comercial y número de catálogo.

II.6.6 Inmunotinción.

La inmunotinción es una técnica usada para detectar la presencia y localizar subcelularmente una o varias proteínas mediante anticuerpos específicos en una muestra de cultivo celular.

En primer lugar, se cultivan las células en placas que contienen cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro y grado #0 (THERMO SCIENTIFIC). Tras ensayar las células de la manera elegida, se fijan con la Solución Fijadora durante 10 minutos. A

continuación, se lava 2 veces con PBS 1X y se incuba en la Solución Permeabilizante durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se aspira dicha solución y se incuba en la Solución de Bloqueo durante 30 minutos.

Por otro lado, se prepara una cámara húmeda que consiste en una placa de cultivo de 10 cm de diámetro con dos papeles 3M humedecidos con agua bidestilada en el fondo y una lámina de Parafilm™ sobre ellos.

Una vez bloqueada la preparación, se diluye el anticuerpo primario en la Solución de Anticuerpo (Tabla 23). Se coloca en la cámara húmeda una gota de 20 µl de dicha dilución y sobre ésta se colocan los cubreobjetos con las células encaradas hacia el fondo y se incuban 1 hora a temperatura ambiente. Una vez finalizada la incubación, se lavan los cubreobjetos con la Solución de Lavado y a continuación se incuban en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente sobre 20 µl de la dilución del anticuerpo secundario en la Solución de Anticuerpo que contiene también Hoechst (Bisbenzimidazole H33258, FLUKA) a una dilución 1:1.000 para la tinción de los núcleos (Tabla 24). Finalmente, se lavan los cubreobjetos con la Solución de Lavado y se montan en un portaobjetos con el medio de montaje Mowiol® 488 (MERCK).

NOMBRE	CASA COMERCIAL	NÚMERO CATÁLOGO	DILUCIÓN
Smad2/3	BD BIOSCIENCE™	610842	1:200
Sirt1	STA. CRUZ	SC-15404	1:100

Tabla 23. Anticuerpos primarios utilizados en inmunotinción. Se indica el nombre del anticuerpo, casa comercial, número de catálogo y dilución usada.

NOMBRE	CASA COMERCIAL	NÚMERO CATÁLOGO	DILUCIÓN
Alexa Fluor® 488 anti IgG de ratón	INVITROGEN	A11001	1:400
Alexa Fluor® 594 anti IgG de conejo	INVITROGEN	A11012	1:400
Alexa Fluor® 594 anti IgG de ratón	INVITROGEN	A11005	1:400

Tabla 24. Anticuerpos secundarios utilizados en inmunotinción. Se indica casa comercial, número de catálogo y dilución usada.

La adquisición de las imágenes se realizó mediante el microscopio confocal LSM 510 META (ZEISS). El análisis de la colocalización de las distintas proteínas teñidas se realizó con el módulo de colocalización del programa informático ZEN (ZEISS).

Soluciones utilizadas en este protocolo:

- **Solución Fijadora:** formaldehído al 4% (v/v) en una solución de PBS 1X.
- **Solución Permeabilizante:** Triton X-100 al 0,3% (v/v) en una solución de PBS 1X.
- **Solución de Bloqueo:** Triton X-100 al 0,1% (v/v), BSA al 0,3% (p/v), Suero Bovino Fetal al 10% (v/v) y leche al 5% (p/v) en una solución de PBS 1X.
- **Solución de Anticuerpo:** Triton X-100 al 0,1% (v/v), BSA al 0,3% (p/v) y Suero Bovino Fetal al 10% (v/v) en una solución de PBS 1X.
- **Solución de lavado:** Triton X-100 al 0,1% (v/v) en una solución de PBS 1X.

II.6.7 Expresión y purificación de proteínas fusionadas al epitopo GST.

II.6.7.1 Expresión de proteínas-GST.

Para la expresión de las proteínas clonadas en el vector pGEX-4T-1, se transforma la cepa competente de *E. coli* BL21 con los plásmidos que llevan las construcciones de interés. La cepa BL21 es comúnmente usada para la producción de proteínas recombinantes en sistemas bacterianos ya que carece de las proteasas *lon* y *ompT* promoviendo la estabilidad de proteínas recombinantes. Tras la transformación, se probaron varias colonias en un ensayo de expresión proteica a pequeña escala para seleccionar las colonias que tengan una mejor expresión de la proteína de interés. Las colonias seleccionadas se utilizaron para realizar un ensayo de expresión proteica como el descrito a continuación. Posteriormente, la proteína expresada es purificada.

Para la realización del ensayo de expresión bacteriana de la proteína de interés, se pone un cultivo de una colonia de la transformación durante toda la noche agitando

a 37 °C en 5 ml de LB-Ampicilina (AMP) (50 µg/ml). Al día siguiente, se inoculan 2 ml del cultivo crecido toda la noche en 200 ml de LB (AMP). Se deja agitando a 37 °C hasta llegar a una OD₆₀₀ de 0,6-0,7 aproximadamente. A continuación, se induce el cultivo con IPTG a una concentración final de 0,5 mM y se deja agitando a 37 °C durante 7 horas. Al finalizar la incubación, el cultivo se centrifuga durante 10 minutos a 4.000 rpm y el pellet se congela para la posterior purificación de las proteínas fusionadas a GST. De cada uno de los pasos se reserva una alícuota de 1 ml. Finalmente, se comprueba la correcta expresión de la proteína mediante la carga de un gel de poliacrilamida y posterior tinción de Coomassie.

II.6.7.2 Purificación de proteínas fusionadas al epitopo GST.

Una vez expresadas las proteínas de fusión con el epitopo GST, se procede a su purificación. Todos los pasos de la purificación de las proteínas de fusión se realizan a 4 °C.

Para la purificación, se resuspende el pellet previamente congelado de la inducción con IPTG con 40 ml de Buffer de Lisis. A esta mezcla se le añade 1/20 del volumen de NP40 (SIGMA ALDRICH) ó Triton X-100 al 10% (v/v) y se sonica con el sonicador Sonopuls (Bandelin). La muestra sonicada se centrifuga y al sobrenadante se añaden 2,5 ml de la solución de la resina Glutathione Sepharose™ 4B (GE HEALTHCARE) que se prepara previamente lavando 3 veces con Buffer de Lisis y resuspendiendo en dicho buffer de manera que la resina quede al 50% (v/v). Esta resina tiene unido glutatión covalentemente para la precipitación de proteínas fusionadas a GST. La mezcla de resina más el sobrenadante del extracto bacteriano se incuba durante 1 hora con rotación constante. Al finalizar la incubación, la resina se lava 3 veces con 40 ml de Buffer A y posteriormente otras 3 veces con 10 ml de Buffer B. Dicha resina se pasa a una columna de elución (Poly Prep® Chromatography Columns de BIORAD) y se lava con 2 ml de Buffer B dejando el buffer pasar por la columna. Por último, la proteína de fusión unida a la resina se eluye con 1 ml de Buffer de Elución, tomando alícuotas del eluido de aproximadamente 150-200 µl. La lectura de la concentración de la proteína de fusión eluida se mide en el espectrofotómetro

NanoDrop 1000 (Thermo SCIENTIFIC). De cada uno de los pasos se reserva una alícuota. Finalmente, se comprueba la correcta purificación de la proteína mediante la carga de un gel de poliacrilamida y posterior tinción de Coomassie.

Soluciones utilizadas en este protocolo:

- **Buffer de lisis:** 50 mM Tris-HCl, pH: 7,3; 0,1 M NaCl; 1 mM EDTA. Añadir fresco: 10 mM DTT; Inhibidor de proteasas (1:400).
- **Buffer A:** 50 mM Tris-HCl, pH: 8; 0,5 M NaCl; 0,1 mM EDTA; Triton X-100 al 0,5% (v/v); Tween-20 al 0,5% (v/v) (SIGMA ALDRICH). Añadir fresco: 5 mM DTT; Inhibidor de proteasas (1:1.000).
- **Buffer B:** 20 mM Tris-HCl, pH: 8; 0,5 M NaCl; 0,1 mM EDTA. Añadir fresco: 5 mM DTT.
- **Buffer de elución:** 20 mM Tris-HCl, pH 9; 0,1 mM EDTA. Añadir fresco: 5 mM DTT; 10 mM L-Glutation reducido (SIGMA ALDRICH). El pH final debe ser 8.

II.6.8 Expresión y purificación de proteínas fusionadas al epitopo 6xHis.

II.6.8.1 Expresión de proteínas fusionadas al epitopo 6xHis.

Para la expresión de las proteínas clonadas en el vector pQE-70, la cepa competente de *E. coli* M15[pREP4] se transforma con los plásmidos que contienen la fusión traduccional de la proteína de interés con el epitopo 6xHis. La cepa M15[pREP4] contiene múltiples copias del plásmido pREP4, el cual expresa constitutivamente el represor lac que reprime la expresión de la proteína clonada en pQE-70 y confiere resistencia a kanamicina (*Kan^R*). La transformación se siembra en placas de LB agar con 100 µg/ml de AMP y 25 µg/ml de kanamicina (Kan). Tras la transformación, se probaron varias colonias en un ensayo de expresión proteica a pequeña escala para seleccionar las colonias que tengan una mejor expresión de la proteína de interés. Las colonias seleccionadas se utilizaron para realizar un ensayo de expresión proteica como el descrito a continuación. Posteriormente, la proteína expresada es purificada.

Para la realización del ensayo de expresión bacteriana de la proteína de interés, se pone un cultivo de una colonia de la transformación durante toda la noche agitando a 37 °C en 10 ml de LB con AMP (100 µg/ml) y Kan (25 µg/ml). Al día siguiente, se inocula todo el cultivo crecido en 250 ml de LB con AMP y Kan, y se deja agitando a 37 °C hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,6 aproximadamente. A continuación, el cultivo se induce con IPTG a una concentración final de 1 mM y se deja agitando a 37 °C durante 4-5 horas. Al finalizar la incubación, el cultivo se centrifuga durante 20 minutos a 4.000 rpm y el pellet se congela para la posterior purificación de las proteínas fusionadas al epitopo 6xHis. De cada uno de los pasos se reserva una alícuota de 1 ml. Finalmente, se comprueba la correcta expresión de la proteína mediante la carga de un gel de poliacrilamida y posterior tinción de Coomassie.

II.6.8.2 Purificación de las proteínas fusionadas al epitopo 6xHis bajo condiciones nativas.

Para la purificación de las proteínas fusionadas al epitopo 6xHis se utilizó el kit de QIAGEN QIAexpress® Ni-NTA Fast Start kit. Todos los buffers de este protocolo los provee el mencionado kit. Brevemente, se resuspende el pellet previamente congelado de la inducción con IPTG con 10 ml de Buffer de Lisis. Dicha suspensión se incuba en hielo durante 30 minutos, agitándola cada 10 minutos. Al finalizar la incubación, el lisado se centrifuga a máxima velocidad durante 30 minutos a 4 °C y se recoge el sobrenadante.

Por otro lado, se prepara la columna Fast Start que contiene la resina con Ni²⁺ conjugado que provee el kit, tal y como indica el fabricante. Sobre dicha columna, se aplica el sobrenadante de la lisis y se deja drenar. Una vez drenado el líquido, se lava la columna 2 veces con 4 ml de Buffer de Lavado Nativo. Finalmente, se eluye la proteína-6xHis unida a la resina con 2 ml de Buffer de Elución Nativo, tomando alícuotas del eluido de aproximadamente 150-200 µl. De cada uno de los pasos se reserva una alícuota. Para finalizar, se comprueba la correcta purificación de la proteína mediante la carga de un gel de poliacrilamida y posterior tinción de Coomassie.

II.6.9 Ensayo His-Pulldown.

El ensayo de His-Pulldown es una técnica que se usa para estudiar la interacción de proteínas *in vitro*.

Para la realización de este ensayo, en la purificación de las proteínas fusionadas al epitopo 6xHis se deja la proteína unida a la resina y no se procede al paso de elución. En su lugar, la resina se lava 3 veces con Buffer de Lisis Total (ver apartado II.6.2.1). Una vez lavada, se toma una alícuota de la resina y se eluye con el Buffer de Elución Nativo. A continuación, se mide la cantidad de proteína de dicho eluido con el espectrofotómetro NanoDrop 1000 para determinar la concentración de la proteína unida a la resina. El resto de la resina que lleva unida la proteína de fusión se congela en una solución de Buffer de Lisis Total con glicerol al 50% (v/v).

Para la realización del ensayo His-Pulldown, se preparan de 10 a 20 μg de resina unida a la proteína de fusión. Dicha resina se lava 3 veces con Buffer de Lisis Total para eliminar el glicerol. A continuación, se bloquea la resina añadiendo 500 μl Buffer de Lisis Total suplementado con inhibidores y BSA al 1% (p/v) y se incuba durante 2 horas a 4 °C con rotación constante. Tras el bloqueo, se lava la resina 3 veces con Buffer de Lisis Total con inhibidores y BSA (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Por otro lado, se añaden 4 μg de la proteína fusionada a GST purificada a 400 μl de Buffer de Lisis Total suplementado hasta 300 mM de NaCl, con inhibidores y BSA (0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Esta mezcla se añade a la resina unida a la proteína de fusión 6xHis previamente bloqueada y se incuba durante 2 horas a 4 °C con rotación constante. Al finalizar la incubación, se lava 3 veces con Buffer de Lisis Total (300 mM de NaCl) con inhibidores incubando los lavados a 4 °C durante 5 minutos. Finalmente, se carga en un gel de poliacrilamida para Western Blot y se realizan los ensayos con anticuerpos contra GST y contra poliHis.

En este trabajo se ha realizado también una variante de este protocolo. En vez de añadirle 4 μg de la proteína fusionada a GST purificada a la resina-proteína-6xHis, se le añaden 10 μl de la primera elución de la proteína Flag-Smad2 que ha sido expresada en células eucarióticas, inmunoprecipitada y posteriormente eluida con el

péptido competidor Flag (ver apartado II.6.5). El resto del protocolo es exactamente igual al descrito anteriormente.

II.7. Técnicas de metaanálisis de expresión génica y mapeo de factores de transcripción.

II.7.1 RNA-Sequencing (RNA-Seq).

La técnica de RNA-Sequencing (RNA-Seq) permite conocer el conjunto total de transcritos de mRNA de una célula eucariota mediante secuenciación a gran escala (high-throughput sequencing). Esta técnica posibilita el análisis del transcriptoma de una célula en una situación determinada de una manera integrada. El desarrollo de

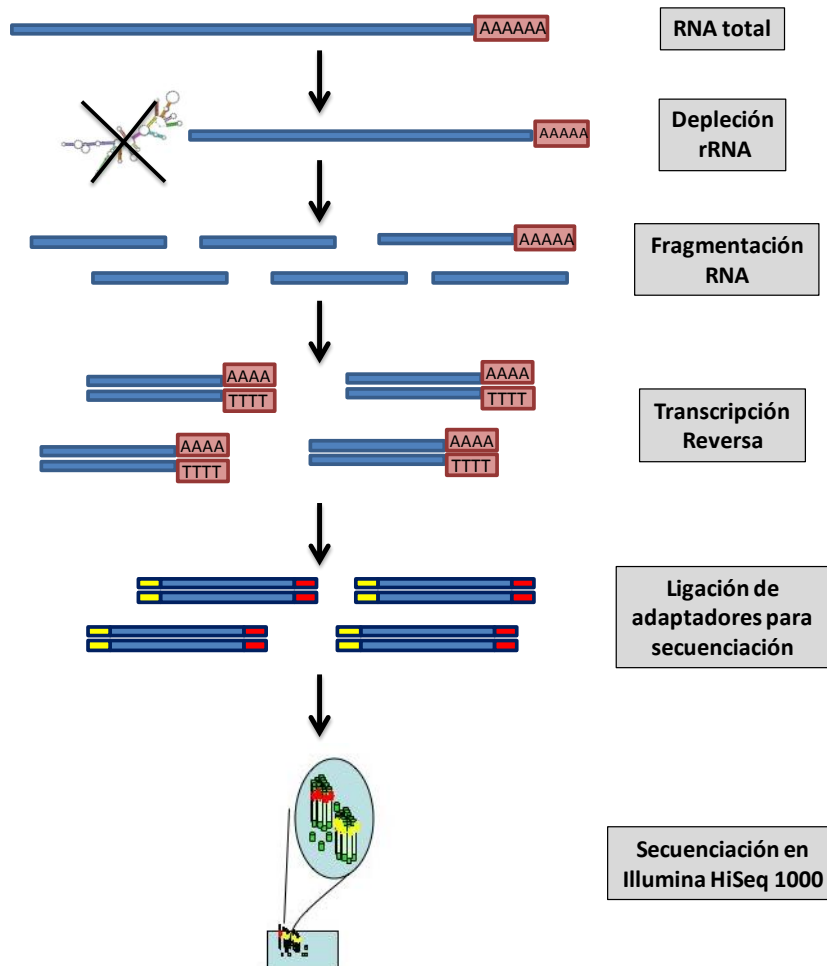


Figura 21. Metodología de la técnica de RNA-Seq. Se detallan los diferentes pasos de los que consta la metodología del RNA-Seq.

esta técnica se llevó a cabo durante una estancia en el laboratorio del Dr. Stunnenberg en el Nijmegen Center of Molecular Life Sciences de la Universidad de Radboud, Nijmegen, Holanda. Para el RNA-Seq, se extrae el RNA total de una célula y se elimina selectivamente el rRNA. Posteriormente, se fragmenta el mRNA, se transcribe de manera reversa y finalmente la ligación de unos adaptadores a la molécula de cDNA posibilita la posterior secuenciación de todas las moléculas de cDNA generadas (Figura 21).

II.7.1.1 Purificación del RNA.

Las células a ensayar se lisan con 1 ml de Trizol y se recogen con una espátula de silicona. A continuación, se añade al lisado celular 200 μ l de cloroformo, se agita vigorosamente durante 15 segundos y se incuba a temperatura ambiente durante 2 minutos. Seguidamente, se centrifuga a máxima velocidad durante 15 minutos y se transfiere la fase acuosa a un nuevo tubo de microcentrífuga. Se extrae el RNA de la fase acuosa con el kit de QIAGEN RNeasy® mini kit incluyendo un paso de digestión con DNAsa. Finalmente, se eluye con 100 μ l de agua libre de RNAsa y se cuantifica el RNA obtenido con el espectrofotómetro Nanodrop 1000.

II.7.1.2 Eliminación selectiva del RNA ribosómico (rRNA).

El análisis del transcriptoma de una célula requiere la eliminación del rRNA de la muestra de RNA total previo a la secuenciación. De esta manera conseguimos una muestra enriquecida en mRNA.

Para la eliminación del rRNA se utilizó el kit Ribo-Zero™ rRNA Removal kit (Epicentre® Biotecnologies). Todas las soluciones mencionadas a continuación las provee el kit. Se prepara la siguiente reacción:

- RNA total (100 ng-250 ng) 16 μ l
- Solución de Eliminación 2 μ l
- Buffer de Reacción 2 μ l

Se incuba la mezcla a 68 °C durante 10 minutos y seguidamente se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Por otro lado, se preparan las microesferas que provee el kit para separar el mRNA del rRNA. Para ello, se toman 35 µl de las microesferas y se realiza un lavado con 70 µl de Solución de Lavado. Sobre el pellet se añaden 35 µl de la Solución de Resuspensión. Finalmente, se añaden 0,5 µl de Riboguard (inhibidor de RNasa) y se mezcla.

Los 20 µl de la muestra que contiene el RNA se añaden a las microesferas preparadas y se mezcla concienzudamente. Dicha mezcla se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos y seguidamente a 50 °C durante 10 minutos. Se transfiere inmediatamente la mezcla RNA-microesferas a la columna que provee el kit y se centrifuga a máxima velocidad durante 1 minuto. Tras la centrifugación, se ajusta el volumen del eluido a 180 µl con agua libre de RNasa, se añade 18 µl de NaAC y 2 µl de glicógeno y se mezcla brevemente con vortex. A continuación, se precipita la muestra libre de rRNA por etanol (ver apartado II.5.1.3). Finalmente, el pellet de la precipitación se disuelve en 32 µl de agua libre de RNasa.

II.7.1.3 Fragmentación del RNA.

La fragmentación del RNA pretende la obtención de tamaños de RNA menores para poder seleccionar en un paso posterior fragmentos de 200 pares de bases (pb). Dicho tamaño de fragmento es el apropiado para posteriormente realizar la secuenciación.

Para fragmentar el RNA se realiza la siguiente mezcla:

- Muestra de RNA (sin rRNA) 32 µl
- 5X Buffer de fragmentación 8 µl

Dicha mezcla se incuba a 95 °C durante 1 minuto e inmediatamente se transfiere a hielo durante 10 minutos. Tras la incubación se añaden 2 µl de glicógeno y

4 μl de NaAC y se precipitan la muestra por etanol (ver apartado II.5.1.3). Finalmente, se disuelve el pellet de la precipitación con 11 μl de agua libre de RNasa.

Solución utilizada en este protocolo:

- **5X Buffer de fragmentación:** 200 mM Tris Acetato pH 8,2 (SIGMA ALDRICH); 500 mM Acetato potásico; 150 mM Acetato magnésico (SIGMA ALDRICH).

II.7.1.4 Síntesis de cDNA por transcripción reversa.

La síntesis de una doble cadena de DNA (cDNA) a partir de un RNA de cadena simple se produce en dos pasos.

1. Para la síntesis de la primera cadena de cDNA se mezclan:

- RNA (el obtenido previamente) (aprox. 100 ng) 10 μl
- 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Random hexamer primer (N6) (Roche) 1 μl

Dicha mezcla se incuba a 70 °C durante 10 minutos. A continuación, se añade la siguiente mezcla y se incuba a 48 °C durante 2 horas:

- 5X 1st Strand buffer (Invitrogen) 4 μl
- 0,1 M DTT 2 μl
- 40 U/ μl Inhibidor de RNasa (Promega) 1 μl
- 10 mM dNTPs 1 μl
- Superscript III (Invitrogen) 1 μl

2. Para la síntesis de la segunda cadena de cDNA, al DNA obtenido de la síntesis de la primera cadena se le añade la siguiente mezcla:

- Agua libre de RNasa 91,8 μl
- 5X Second Strand Buffer (Invitrogen) 30 μl
- 10 mM dNTPs 3 μl
- *E. coli* Polimerasa I (Invitrogen) 4 μl
- *E. coli* DNA ligasa (10 U/ μl)(New England Biolabs) 1 μl

- RNasa H (10 U/μl) (Ambion®) 0,2 μl

La mezcla se incuba a 16 °C durante 2 horas. Posteriormente, se añade 1 μl de T4 DNA polimerasa (10 U/μl) (New England Biolabs), se incuba durante 10 minutos a 16 °C y directamente se transfiere la muestra a hielo o congelador. Finalmente, se purifica la muestra mediante el kit MiniElute Reaction Clean-up de QIAGEN eluyendo en 2 tandas de 10 μl para obtener finalmente un volumen total de 20 μl.

II.7.1.5 Preparación de la muestra para la secuenciación.

La muestra se secuencia con el equipo Illumina Genome Analyzer II. Dicha muestra se prepara mediante la adición de los adaptadores necesarios para la hibridación de la muestra con el soporte de secuenciación. Son varios los pasos necesarios para dicha preparación.

I. Adición de una base A al extremo 3' del DNA.

Se añade una base A (adenina) al extremo 3' de los fragmentos romos de DNA fosforilados, lo cual prepara los fragmentos de DNA para la ligación de los adaptadores que tienen una T (timina) saliente en su extremo 3'. Para ello, se trata la muestra de cDNA con Klenow exo (3'-5'exo) (New England Biolabs) y dATP siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras el tratamiento, la solución se purifica mediante el kit MiniElute Reaction Clean-up de QIAGEN eluyendo con 10 μl.

II. Ligación de adaptadores.

Se ligan los adaptadores al extremo de los fragmentos de DNA preparándolos para ser hibridados al soporte de secuenciación. La secuencia de dichos adaptadores que provee la casa Illumina (Oligonucleotide sequences © 2006 and 2008 Illumina, Inc. All rights reserved) se detalla en la tabla 25.

NOMBRE	SECUENCIA
Adaptador 1	5' P-GATCGGAAGAGCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG
Adaptador 2	5' ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT

Tabla 25. Adaptadores de secuenciación para Illumina Genome Analyzer II. Se indica nombre y secuencia.

La muestra de DNA se liga a los adaptadores de secuenciación (100 μ M), diluidos 1:10, con la enzima T4 DNA Ligasa (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante. La mezcla realizada se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos y posteriormente se purifica mediante el kit MiniElute Reaction Clean-up de QIAGEN eluyendo con 10 μ l.

III. Selección de tamaño en E-Gel®.

La secuenciación requiere un rango de tamaño de DNA determinado. Para este caso, se seleccionó el tamaño de DNA de 200 pb. Este protocolo elimina los adaptadores de secuenciación que hay en exceso y selecciona el rango de tamaño apropiado para la secuenciación utilizando el E-Gel® iBase™ Power System (Invitrogen). La metodología de carga de este gel específico se realizó según indicaciones del fabricante. Una vez seleccionado, el volumen del DNA recogido se ajusta a 36 μ l con agua.

IV. Enriquecimiento de los fragmentos de DNA modificados con los adaptadores por PCR.

Para el enriquecimiento de los fragmentos de DNA se realiza una amplificación por PCR con la enzima DNA polimerasa de alta fidelidad Phusion® (New England Biolabs) con primers específicos que provee la casa Illumina (Oligonucleotide sequences © 2006 and 2008 Illumina, Inc. All rights reserved) (Tabla 26). La reacción de PCR se realizó según indicaciones del fabricante. Posteriormente, se purifica el producto mediante el kit QIAquick PCR purification kit de QIAGEN eluyendo en 30 μ l.

NOMBRE	SECUENCIA
Primer 1.1	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT
Primer 2.1	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGCTCTTCCGATCT

Tabla 26. Primers para la amplificación de fragmentos de DNA modificados con los adaptadores. Se indica nombre y secuencia.

II.7.1.6 Control de calidad.

Antes de secuenciar la muestra preparada, se realizan dos pasos de control de calidad. En primer lugar, se mide la concentración del DNA con el fluorómetro Qubit® 2.0 utilizando el kit Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen). Por último, se comprueba la pureza y la distribución de tamaños en el BioRad Experion™ Automated Electrophoresis Station.

II.7.1.7 Secuenciación.

Una vez comprobado que la pureza y el tamaño de la muestra son los adecuados, se procede a la secuenciación de la muestra en el multisequenciador Illumina Genome Analyzer II. Los pasos detallados de la secuenciación son los siguientes (Figura 22):

1. Se unen los fragmentos de cadena simple de DNA al soporte de secuenciación.
2. Se produce la amplificación en puente con nucleótidos no marcados, generando un DNA de doble cadena.
3. Se desnaturaliza la doble cadena de DNA.
4. Se amplifica el DNA, tras lo cual varios millones de clusters densos de DNA de doble cadena son generados en cada canal del soporte de secuenciación.
5. Se realiza el primer ciclo químico: determinación de la primera base mediante la adición de terminadores reversibles marcados, primers y la enzima DNA polimerasa.
6. Después de la excitación con el láser se captura la imagen de fluorescencia emitida de cada cluster. Antes de iniciar el siguiente ciclo, se eliminan los extremos 3' bloqueados y el fluoróforos por cada base incorporada.
7. Repetición del paso 6: segundo ciclo químico.
8. Repetición del paso 7.
9. Se realizan más ciclos químicos (repetición del paso 6 y 7) hasta determinar la secuencia de bases de los fragmentos a secuenciar.

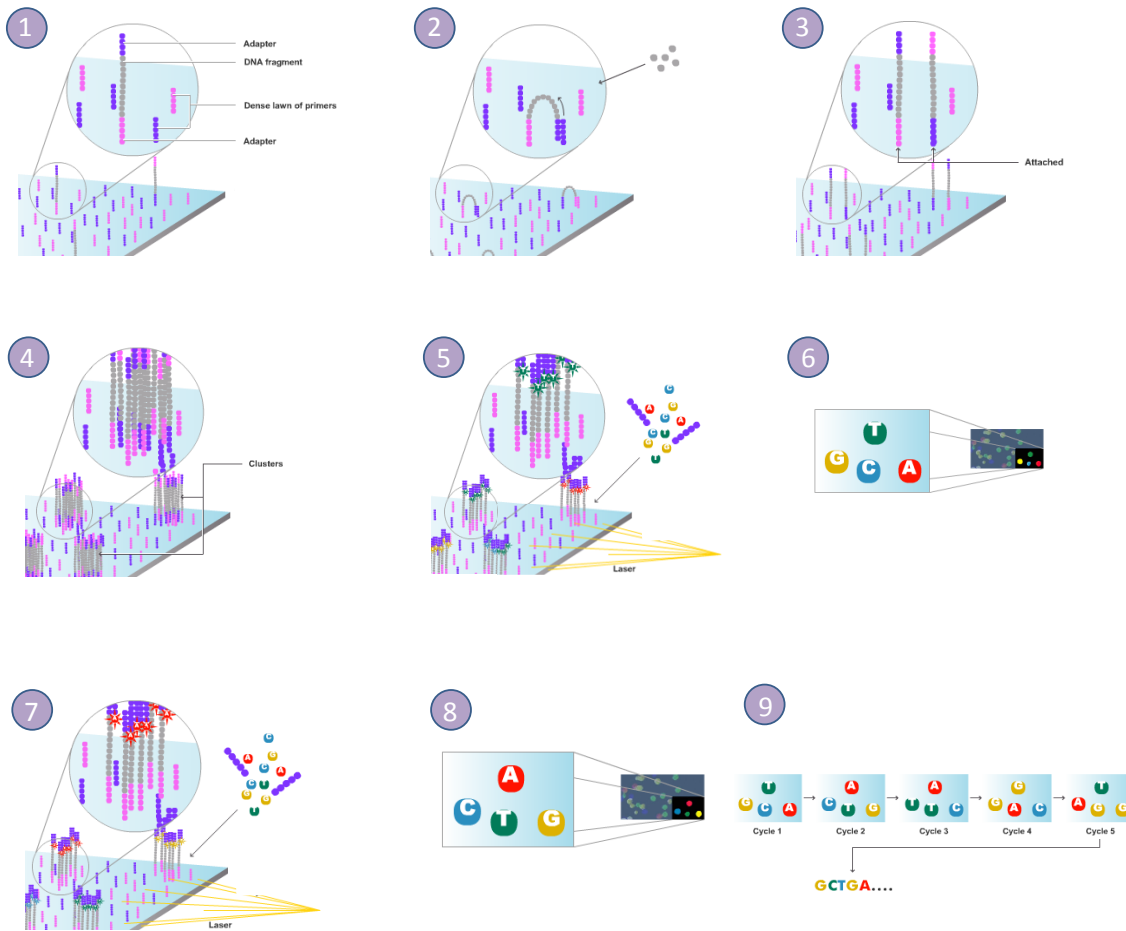


Figura 22. Pasos de la secuenciación en el multisequenciador Illumina Genome Analyzer II. Esquema cedido por Illumina (165).

II.7.1.8 Análisis.

Las herramientas utilizadas para el análisis de los datos obtenidos de la secuenciación son las siguientes:

- Genomatix genome analyzer, Region Miner task (166): herramienta utilizada para calcular los valores de expresión de todos los transcritos/genes disponibles en El Dorado (base de datos) y realizar un análisis diferencial de los genes que varían su expresión con respecto la muestra control.
- Linux y Excel: herramientas utilizadas para filtrar las listas de transcritos generadas por Genomatix. Este análisis fue realizado en colaboración con el Dr. Carrillo de Santa Pau, bioinformático del laboratorio del Dr. Stunnenberg.

- Diagramas de Venn (167): Herramienta interactiva que sirve para comparar listas entre ellas.
- Gen GO, METACORE™: plataforma de metaanálisis utilizada para la realización de un análisis funcional de los genes obtenidos en el análisis del RNA-Seq (168). Este análisis se realizó con la herramienta *Functional Ontology Enrichment: Pathway maps*, que analiza las vías de señalización que están significativamente afectadas en los datos analizados. Es decir, las vías de señalización en las que el número de genes modificados por el tratamiento a analizar es significativo con respecto al número total de genes implicados en dicha vía. Este análisis fue realizado en colaboración con la Dra. Marta Agudo, investigadora de la Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias (FFIS).

El desarrollo del análisis del RNA-Seq se expone con más detalle en el apartado III.12.1.

II.7.2 Chromatin Immunoprecipitation-Sequencing (ChIP-Seq).

La técnica de Chromatin Immunoprecipitation-Sequencing (ChIP-Seq) es una técnica que permite determinar el mapa global de sitios de unión al DNA para cualquier proteína de interés. Esta técnica combina la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con la secuenciación masiva del DNA (Seq), lo que permite identificar el cistroma de genes al que se une una proteína (Figura 23). Esta técnica se realizó durante una estancia en el laboratorio del Dr. Stunnenberg en el Nijmegen Center of Molecular Life Sciences de la Universidad de Radboud, Nijmegen, Holanda.

II.7.2.1 Extracción de cromatina.

Para la extracción de la cromatina celular, se utiliza una suspensión celular de 5×10^6 células/ml. A esta suspensión se añade 1/10 del volumen de Buffer A con 11% formaldehído (v/v) para unir covalentemente las proteínas unidas al DNA (crosslink). Dicha mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente con

rotación lenta. Tras la incubación, se para la reacción añadiendo 1/10 del volumen de 1,25 M de glicina fría (SIGMA ALDRICH) y se precipita mediante centrifugación. A continuación, se realizan un lavado con PBS frío y posteriormente dos incubaciones sucesivas con los Buffer B y C con rotación lenta en condiciones de frío. Tras las incubaciones, las células se resuspenden en 1X Buffer de Incubación + 1X Protease Inhibitor Cocktail (PIC) (Rock) a una concentración final de 10^6 células por 30 μ l. La cromatina se fracciona con el sonicador Bioruptor® y posteriormente se centrifuga a máxima velocidad durante 5 minutos. El sobrenadante generado se almacena a -80 °C.

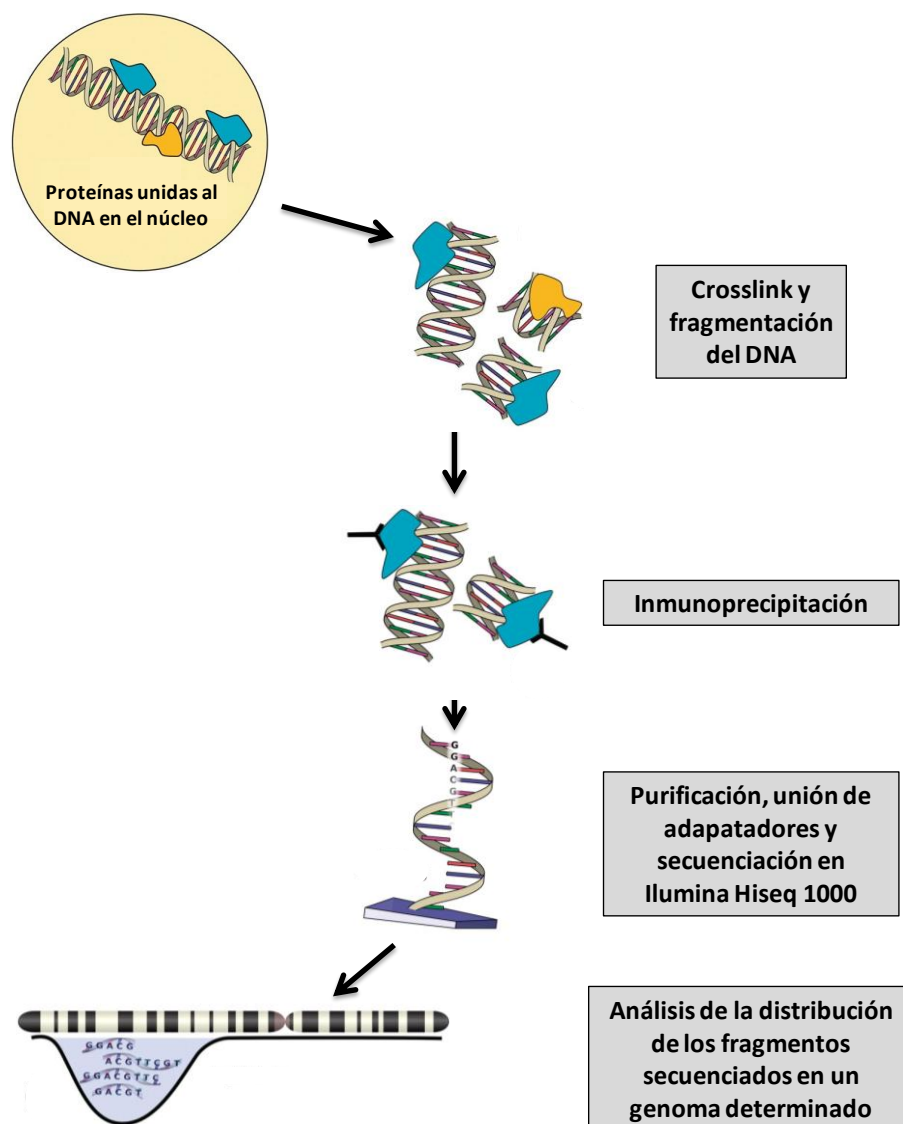


Figura 23. Metodología de la técnica de ChIP-Seq. Se detallan los diferentes pasos de los que consta la metodología del ChIP-Seq.

Soluciones utilizadas en este protocolo:

- **Buffer A:** 148 mM NaCl; 1,48 mM EDTA; 0,74 mM EGTA; 74 mM HEPES pH 7,6. Añadir fresco: formaldehído al 11% (v/v) (SIGMA ALDRICH).
- **Buffer B:** Triton X-100 al 0,25% (v/v); 10 mM EDTA; 0,5 mM EGTA; 20 mM HEPES pH 7,6.
- **Buffer C:** 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,5 mM EGTA; 50 mM HEPES pH 7,6.
- **5X Buffer de Incubación:** SDS al 0,75% (p/v); Triton X-100 al 5% (v/v); 750 mM NaCl; 5 mM EDTA; 2,5 mM EGTA; 100 mM HEPES. Añadir en fresco: PIC 1X.

II.7.2.2 ChIP: Inmunoprecipitación de cromatina.

Una vez extraída la cromatina, se procede a la inmunoprecipitación con anticuerpos específicos para la proteína de interés. De cada muestra se realizan 5 inmunoprecipitaciones en paralelo con el fin de obtener suficiente muestra para secuenciar.

Para la inmunoprecipitación de cromatina se usa la resina A/G PLUS-Agarose (Santa Cruz Biotechnology). Se toman 50 µl de la solución 50/50 (resina/buffer) y se lava 2 veces con 1X Buffer de Incubación suplementado con BSA al 0,1% (v/v). Dicha suspensión se incuba en el Buffer de Incubación (+ BSA) durante 1 hora a 4 °C con rotación constante y finalmente se resuspende en el mismo buffer de manera que la resina se quede al 50% (v/v).

Para la inmunoprecipitación se realiza la siguiente mezcla:

- | | |
|---------------------------|------------------|
| • BSA al 0,1% (v/v) | 3 µl (stock 10%) |
| • PIC (25X) | 10 µl |
| • 5X Buffer de Incubación | 40 µl |
| • Cromatina | 100 µl |
| • Resina A/G | 30 µl |
| • Anticuerpo | X µl |
| • Agua ultra pura | 117 - X |

Dicha mezcla se incuba durante toda la noche a 4 °C con rotación constante. Al día siguiente, se realizan sucesivos lavados con los diferentes buffers mencionados a continuación, realizando una incubación con el buffer durante 5 minutos a 4 °C con rotación constante entre cada lavado. Se realizan dos lavados con Buffer de lavado 1, un lavado con Buffer de lavado 2, un lavado con Buffer de Lavado 3 y finalmente dos lavados con Buffer de Lavado 4. En el último lavado se elimina el buffer y se deja el pellet de resina. A continuación, se añaden 200 µl de Buffer de Elución y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente con rotación constante. Se centrifuga, se recoge el sobrenadante y se añaden 8 µl de NaCl 5 M. Por otro lado, se toman 50 µl de la cromatina sin inmunoprecipitar (input) y se añade Buffer de Elución hasta 200 µl y 8 µl de NaCl 5 M. Las mezclas del eluido y el input se incuban a 65 °C agitando durante 4 horas (decrosslink). Este proceso elimina la unión de proteínas al DNA. Tras la incubación, se purifica la muestra de DNA con el kit QIAquick PCR purification kit de QIAGEN y se eluye con 30 µl tanto la muestra de ChIP como el input. Finalmente, se mezclan las 5 muestras inmunoprecipitadas en un solo tubo y se mide la cantidad de DNA inmunoprecipitado.

El anticuerpo utilizado en este trabajo para la técnica de ChIP-Seq fue un anticuerpo anti GFP (2 µl por muestra). Dicho anticuerpo fue sintetizado y cedido por el Dr. Michiel Vermeulen, PhD del University Medical Center Utrecht (Holanda).

Soluciones utilizadas en este protocolo:

- **Buffer de lavado 1:** SDS al 0,1% (p/v); Deoxicolato sódico al 0,1% (p/v); Triton X-100 al 1% (v/v); 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,5 mM EGTA; 20 mM HEPES.
- **Buffer de lavado 2:** SDS al 0,1% (p/v); Deoxicolato sódico al 0,1% (p/v); Triton X-100 al 1% (v/v); 500 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,5 mM EGTA; 20 mM HEPES.
- **Buffer de lavado 3:** 250 mM LiCl; Deoxicolato sódico al 0,5% (p/v); NP-40 al 0,5% (v/v); 1 mM EDTA; 0,5 mM EGTA; 20 mM HEPES.
- **Buffer de lavado 4:** 1 mM EDTA; 0,5 mM EGTA; 20 mM HEPES.

- **Buffer de elución:** SDS al 1% (p/v); 0,1 M NaHCO₃ (SIGMA ALDRICH). Este buffer se prepara el mismo día del experimento. No almacenar.

II.7.2.3 Control de calidad.

Antes de someter la muestra al proceso de secuenciación, se realiza un control de calidad de la misma mediante la amplificación de secuencias conocidas a las que se une la proteína de interés que hemos inmunoprecipitado.

El protocolo de PCR a tiempo real realizado se describe anteriormente (apartado II.5.3, diseño con el programa "Primer 3"). En este caso en concreto, la PCR a tiempo real se hizo sobre las muestras inmunoprecipitadas y sobre los inputs. Para dicha PCR la muestra de input se diluyó 1:200.

Los datos de las qPCR realizadas como control de calidad del ChIP se representan de dos maneras:

1. Recuperación. Es el porcentaje de DNA inmunoprecipitado con respecto a la muestra de cromatina sin inmunoprecipitar. Para el cálculo de la Recuperación de cada muestra se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Recuperación} = 2^{(CT_{\text{input}} - CT_{\text{IP}})} \times K \times 100$$

Donde CT_{input} es el valor CT del input; CT_{IP} es el valor CT de la muestra inmunoprecipitada; K es un factor cuyo valor depende de la cantidad de cromatina usada para la inmunoprecipitación y de la dilución de la cromatina utilizada para la IP comparado con la muestra input; 100 se utiliza para el cálculo del porcentaje.

2. Ocupación. Es la ocupación de la proteína inmunoprecipitada en los promotores analizados con respecto a la ocupación residual, refiriéndose a la ocupación del promotor usado como control negativo. Para el cálculo de la Ocupación de cada muestra se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Ocupación} = \frac{\text{Valor Recuperación promotor problema}}{\text{Valor Recuperación promotor control negativo}}$$

II.7.2.4 Preparación de la muestra de ChIP para la secuenciación.

La muestra se secuencia con el equipo Illumina Genome Analyzer II. Dicha muestra se prepara mediante la adición de los adaptadores necesarios para la hibridación de la muestra al soporte de secuenciación. Son varios los pasos necesarios para dicha preparación.

I. Reparación de los extremos.

Para la ligación de los adaptadores de secuenciación, es necesario la generación de extremos romos fosforilados en el DNA inmunoprecipitado. Usando T4 DNA polimerasa, *E. coli* DNA Pol I large fragment (Klenow polimerasa) y T4 Polinucleotido kinasa (New England Biolabs), se transforman los extremos cohesivos de los fragmentos de DNA inmunoprecipitados en extremos romos fosforilados.

Para ello, se prepara la siguiente mezcla:

• DNA inmunoprecipitado	30 μ l
• Agua	10 μ l
• T4 DNA ligasa buffer con 10 mM ATP	5 μ l
• dNTP mix (10 mM)	2 μ l
• T4 DNA polimerasa	1 μ l
• DNA polimerasa Klenow diluida 1:5 (New England Biolabs)	1 μ l
• T4 Polinucleotido kinasa (New England Biolabs)	1 μ l

Se incuba a 20 °C durante 30 minutos. Al finalizar la incubación, se purifica mediante el kit QIAquick PCR purification kit de QIAGEN eluyendo con 34 μ l.

II-V. Adición de una base A al extremo 3' del DNA/ Ligación de adaptadores/ Selección de tamaño en E-Gel®/ Enriquecimiento de los fragmentos de DNA modificados con los adaptadores por PCR.

Estos 4 pasos de preparación de la muestra para la secuenciación son iguales a los descritos para el RNA-Seq, con la única diferencia que en la selección de tamaño en E-Gel® se seleccionan fragmentos de 300 pb.

II.7.2.5 Control de calidad del ChIP.

Antes de la secuenciación, los controles de calidad que se llevan a cabo son los mismos que para las muestras de RNA-Seq.

II.7.2.6 Secuenciación.

La secuenciación se realizó de la misma manera que las muestras de RNA-Seq.

II.7.2.7 Análisis.

La herramienta utilizada para la visualización de los perfiles de unión de GFP-Smad2 al DNA (ChIP-Seq) es la página web UCSC Genome Browser (169), desarrollada por el "Genome Bioinformatics Group" del Center for Biomolecular Science and Engineering (CBSE) en la universidad de California Santa Cruz (UCSC).

El desarrollo del análisis de ChIP se expone con más detalle en los apartados III.12.2, III.12.3.1, III.12.3.3 y III.12.3.4.

II.8. Otras técnicas y métodos.

II.8.1 Ensayo de DNA-Pulldown.

El ensayo DNA-Pulldown (DNAP) es una técnica utilizada para estudiar interacciones proteína-DNA. En esta técnica, se prepara una secuencia de DNA sintética unida a biotina que es recuperada de un extracto proteico mediante el uso de agarosa-estreptavidina. Una vez realizado el pulldown, se puede estudiar mediante Western Blot si la proteína de interés se ha unido a esa secuencia de DNA específica. Varios pasos son necesarios para la realización de un DNAP:

1. Generación de DNA de doble cadena. Para la realización del ensayo, es necesario preparar la muestra de DNA de doble cadena que tiene la secuencia de

interés unida a biotina y además otra con secuencia similar pero alterada que nos servirá de control negativo (mutante). Para obtener una molécula de doble cadena, se mezclan los oligonucleótidos de cadena simple por parejas (F+R) para obtener una solución con una concentración final de 1 µg/µl de DNA de doble cadena: 0,5 µg/µl de Oligo-Fw + 0,5 µg/µl de Oligo-Rev + 1X New England Biolabs 2 buffer (10X).

Una vez realizada la mezcla, ésta se calienta a 95 °C durante 5 minutos en un termobloque. A continuación, se dejar enfriar durante 2 horas en el mismo termobloque para que el enfriamiento sea progresivo.

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo para el DNAP se detallan en la tabla 27.

NOMBRE	SECUENCIA
<i>c-jun</i> SBR WT Fw	Biotina-GGAGGTGCGCGGAGTCAGGCAGACAGACAGACACAGCCAGCCAGCCAGGTCCGGCA
<i>c-jun</i> SBR WT Rev	TGCCGACCTGGCTGGCTGGCTGTGTCTGTCTGTCTGCCTGACTCCGCGCACCTCC
<i>c-jun</i> SBR Mutante Fw	Biotina-GGAGGTGCGCGGAGTCAGGCATATATATATATACAGCATGCATGCATGGTCCGGCA
<i>c-jun</i> SBR Mutante Rev	TGCCGACCATGCATGCATGCTGTATATATATATATGCCTGACTCCGCGCACCTCC
DE WT Fw	Biotina-CTAGCCATTAATCAGATTAACGGTGAGCAATTAGACTAG
DE WT Rev	CTAGTCTAATTGCTCACCGTTAATCTGATTAATGGCTAG
DE Mutante Fw	Biotina-CTAGCCAGTCATCAGAGTCACGGTGAGCAAGTCGACTAG
DE Mutante Rev	CTAGTCGACTTGCTCACCGTGACTCTGATGACTGGCTAG
Oligonucleótido mutante competidor	GGAGGTGCGCGGAGTCAGGCATATATATATATACAGCATGCATGCATGGTCCGGCA

Tabla 27. Oligonucleótidos utilizados en la técnica de DNA-Pulldown. Se indica nombre del oligonucleótido y secuencia.

2. Preparación de la resina. Utilizamos NeutrAvidin® Agarose Resin de Thermo, una resina capaz de unir con alta afinidad biotina. Se preparan 30 µl de la solución 50/50 (resina/buffer) y se equilibra con Buffer 140 mM NaCl. Finalmente, se resuspende la resina en el Buffer 140 mM NaCl de manera que la resina quede al 50% (v/v).

3. DNAP. Este proceso se realiza tanto con el oligonucleótido silvestre (WT) como mutante. Se incuba la resina con 5 µg de DNA de cadena doble durante 1 hora a 4 °C con rotación constante. Una vez incubado, se lavan el DNA conjugado con la resina 3 veces con el Buffer 140 mM NaCl y se resuspende dicha mezcla en el mismo buffer de

manera que la resina quede al 50% (v/v). Se añaden 20 µg del oligonucleótido mutante competidor u oligonucleótido no biotinilado para competir con la unión de proteínas no específicas.

Por otro lado, se preparan 300 µg de extracto nuclear previamente diluido a 140 mM de NaCl. En este momento se puede añadir al extracto una proteína exógena e incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se añaden los extractos nucleares a la resina conjugada con el DNA de doble cadena y se incuba dicha mezcla a 4 °C durante toda la noche en agitación constante. Tras la incubación, se lava 3 veces con el Buffer 140 mM NaCl y se analiza mediante Western Blot la presencia de las proteínas de interés.

Solución utilizada en este protocolo:

- **Buffer 140 mM NaCl:** se realiza a partir del Buffer Hipotónico 10 mM NaCl (descrito en el apartado II.6.2.2). Añadir fresco: Inhibidor de proteasas (1:1.000).

II.8.2 Ensayo de luciferasa.

El ensayo de luciferasa nos permite medir la activación o represión transcripcional de promotores de genes específicos. Esta técnica utiliza promotores específicos fusionados transcripcionalmente al gen de la luciferasa, a los que denominamos genes chivato. De esta manera se puede medir la transcripción génica al correlacionar con las variaciones en la actividad luciferasa.

En primer lugar, las células se transfectan con el plásmido que contiene el gen chivato y el factor de transcripción necesario para su activación. Además, también se introduce una cantidad de luciferasa Renilla (Rluc) que permite normalizar la eficacia de la transfección. Adicionalmente, se pueden transfectar las células con los plásmidos que contienen genes que queremos sobreexpresar o el siRNA para eliminar la expresión de una determinada proteína. El plásmido pEF-XC se incluye en la proporción necesaria para normalizar las cantidades de DNA transfectado y la potencia de los promotores. Cada ensayo se realiza por triplicado. En este trabajo se

realizaron dos tipos de ensayos, uno donde se sobreexpresó la proteína Sirt1 y otro donde se eliminó la expresión de Sirt1. Los porcentajes de cada uno de los diferentes DNAs plasmídicos a transfectar en cada uno de los ensayos son los siguientes:

1. DE-Luc (50%), Rluc (20%), Flag-Mixer (10%), proteína sobreexpresada (10%), plásmido XC (10%).
2. DE-Luc (25%), Rluc (10%), Flag-Mixer (5%), siRNA (50%), plásmido XC (10%).

Dos días después se tratan las células de la manera elegida y se realiza la medida de la actividad luciferasa con el kit de Promega "Dual-Luciferase® Reporter Assay System" siguiendo las instrucciones del fabricante. En este kit, la actividad de las luciferasas firefly y Renilla es medida secuencialmente para una sola muestra. La medida de la actividad luciferasa se realizó con el luminómetro Lucy2 de la casa comercial ANTHOS utilizando el protocolo que proporciona el kit "Dual-Luciferase® Reporter Assay System". Los datos que se representan como Actividad luciferasa, son la normalización de la actividad de luciferasa firefly con respecto a la actividad de Renilla.

II.8.3 Separación celular por fluorescencia.

La separación celular por fluorescencia (FACS: fluorescence-activated cell sorting) es un tipo especial de citometría de flujo que permite purificar una población de células de interés en una población celular heterogénea basándose en las características fluorescentes de cada célula. En el caso de este trabajo, se seleccionaron células GFP positivas, de una población mixta de células transfectadas con un plásmido que expresa simultáneamente el siRNA contra Sirt1 y la proteína GFP.

En primer lugar, las células se transfectan con el plásmido que expresa la proteína GFP y permite detectar las células transfectadas. 24 horas después, las células en cultivo se tripsinizan y se dejan diluidas en medio de cultivo. Posteriormente, la solución celular se filtra para desechar las agrupaciones celulares y seguidamente se separa la población celular elegida con el uso de un citómetro de separación celular de alta velocidad MoFlo® (Beckman Coulter). La población celular que se genera contiene

en torno al 90% de células GFP positivas. Tras este procedimiento, las células aisladas son cultivadas otra vez para su posterior uso.

III. RESULTADOS

III.1. Búsqueda de nuevas moléculas que interaccionan con Smad2. Sistema Doble Híbrido Cyto Trap®.

III.1.1 Estudio de Smad2 como proteína cebo.

El Sistema Doble Híbrido Cyto Trap® utiliza la cepa de *S. Cerevisiae cdc25α* que posee una mutación puntual en el gen *cdc25* que le confiere un fenotipo termosensible en el que las células a 25 °C proliferan de manera óptima y a 37 °C no lo hacen. Esta cepa es auxótrofa para los aminoácidos leucina y uracilo, lo que se aprovecha para la selección de los plásmidos pSos y pMyr por complementación. Además, la expresión de la proteína del plásmido pMyr es activada por galactosa y reprimida por glucosa. Para que la cepa de *S. Cerevisiae cdc25α* pueda proliferar a 37 °C (condiciones restrictivas) se debe producir la interacción entre la proteína cebo fusionada a hSos (homólogo humano del gen de *S. Cerevisiae cdc25*) y la proteína fusionada a Myr. Dicha interacción localiza la proteína hSos en la membrana citosólica, provocando la activación de Ras y por tanto la proliferación de la levadura.

El primer paso fue la comprobación de la idoneidad de Smad2 como proteína cebo. Para ello, se clonaron en el plásmido pSos, Smad2 en su longitud total y diferentes fragmentos que corresponden a combinaciones de los diferentes dominios funcionales de Smad2 (Tabla 28). Como elemento de interacción positiva se clonó la proteína Smad4 en el plásmido pMyr (Tabla 28).

Levaduras *S. Cerevisiae cdc25α* competentes fueron transformadas con las diferentes construcciones Sos-Smad2 y co-transformadas con pMyr-Smad4. Como control negativo de interacción las levaduras se co-transformaron con pSos y pMyr-Smad4. Las transformaciones fueron cultivadas en medio selectivo SD-glucosa a 25 °C y posteriormente sembradas en las condiciones de cultivo SD-glucosa y SD-galactosa a 37 °C. A este ensayo de siembra de las levaduras en SD-glucosa y SD-galactosa a 37 °C lo denominamos Prueba de Interacción. El criterio de selección utilizado para considerar una interacción válida entre la construcción de Smad2 en el plásmido pSos y el clon del plásmido pMyr (Smad4), es que la levadura transformada

prolifere en condiciones restrictivas en SD-galactosa y no en SD-glucosa (Tabla 29). Los fragmentos de Smad2 que cumplían esas condiciones se consideraron candidatos idóneos para proteína cebo.

INSERTO	PLÁSMIDO
Smad2 1-468 (MH1-L-MH2)	pSos
Smad2 1-173 (MH1)	pSos
Smad2 173-273 (L)	pSos
Smad2 273-468 (MH2)	pSos
Smad2 1-273 (MH1-L)	pSos
Smad2 173-468 (L-MH2)	pSos
Smad2 94-468 (1/2MH1-L-MH2)	pSos
Smad2 94-273 (1/2MH1-L)	pSos
Smad4	pMyr

Tabla 28. Diferentes clonaciones realizadas en los plásmidos pSos y pMyr. Se indica el nombre del fragmento clonado especificando los aminoácidos correspondientes a dicho fragmento y los dominios que comprende, y el plásmido donde se realizó la clonación.

RESULTADO	25 °C	37 °C	37 °C
	SD-GLUCOSA	SD-GLUCOSA	SD-GALACTOSA
Interacción válida	+	-	+
No interacción	+	-	-
Termorrevertiente	+	+	+

Tabla 29. Diferentes posibilidades de proliferación en la Prueba de Interacción. Se indican los tres modos posibles de proliferación de las levaduras en la Prueba de Interacción: Interacción, No interacción y Termorrevertiente. Se destaca en gris oscuro las condiciones requeridas para considerar qué construcción Sos-Smad2 es apropiada para proteína cebo.

Los resultados de la Prueba de Interacción realizada con las distintas construcciones de Smad2 en pSos se detallan en la tabla 30. Los clones que cumplían los criterios de selección fueron Smad2 173-468 (L-MH2) y Smad2 94-468 (1/2MH1-L-MH2). Se comprobó la expresión de ambas construcciones en levaduras mediante Western Blot utilizando un anticuerpo contra Sos. Ambas construcciones se expresaban y mostraban el tamaño correcto en electroforesis de poliacrilamida. Se decidió usar como proteína cebo la construcción Smad2 94-468 (1/2MH1-L-MH2) ya

que conserva la mayor parte de la longitud de Smad2 pues solamente carece de los 93 primeros aminoácidos del extremo N-terminal. A dicha construcción la denominamos Smad2 Δ 93.

DNA	25 °C	37 °C	37 °C
	SD-GLUCOSA	SD-GLUCOSA	SD-GALACTOSA
pSos	+	-	-
Smad2 1-468 (MH1-L-MH2)	+	+	+
Smad2 1-173 (MH1)	+	+	+
Smad2 173-273 (L)	+	-	-
Smad2 273-468 (MH2)	+	-/+	+
Smad2 1-273 (MH1-L)	+	-/+	-
Smad2 173-468 (L-MH2)	+	-	+
Smad2 94-468 (1/2MH1-L-MH2)	+	-	+
Smad2 94-273 (1/2MH1-L)	+	-	-

Tabla 30. Resultado de la proliferación de las diferentes co-transformaciones de las construcciones de Smad2 en pSos y Smad4-pMyr en la Prueba de Interacción. Levaduras *S. Cerevisiae* cdc25 α competentes fueron transformadas con cada una de las construcciones pSos y co-transformadas con pMyr-Smad4. Dichas transformaciones fueron cultivadas en medio selectivo SD-glucosa a 25 °C y posteriormente sembradas en condiciones de SD-glucosa y SD-galactosa a 37 °C (Prueba de Interacción). Se detalla la proliferación de dichas levaduras transformadas en las condiciones de SD-glucosa a 25 °C y 37 °C, y SD-galactosa a 37 °C. -: No proliferación de la levadura; +: Proliferación de la levadura; -/+: Proliferación leve de la levadura. Se destaca en gris oscuro las dos construcciones que cumplen los criterios de selección.

III.1.2 Búsqueda de moléculas que interaccionan con Smad2 Δ 93.

Realizamos la búsqueda de moléculas que interaccionan con Smad2 Δ 93 en el contexto de una librería de expresión obtenida de un tejido mayoritariamente epitelial. Para ello, utilizamos una librería de expresión de epitelio pulmonar humano de adulto, en adelante en este trabajo referida como pMyr-Librería(PH). Dicha búsqueda se llevó a cabo co-transformando levaduras *S. Cerevisiae* cdc25 α competentes con el plásmido pSos-Smad2 Δ 93 (proteína cebo) y la librería de epitelio pulmonar adulto (pMyr-Librería(PH)). Las levaduras transformadas se cultivaron en SD-glucosa a 25 °C durante dos días para permitir la proliferación celular. Posteriormente, se replicó a placas de SD-galactosa en condiciones restrictivas (37 °C), donde se produce la

expresión del plásmido pMyr. A las colonias crecidas en SD-galactosa las denominamos Candidatos Interactores. Se comprobó la interacción con Smad2Δ93 de los Candidatos Interactores. Las colonias obtenidas fueron replicadas en placas de SD-glucosa a 25 °C para reprimir la expresión del plásmido pMyr. A los dos días se realizó una Prueba de Interacción sembrando las colonias en las respectivas condiciones selectivas (Tabla 29). Así, sólo en el caso en el que se observó proliferación en SD-galactosa a 37 °C y no en SD-glucosa a 37 °C se consideró una interacción válida y por tanto se procedió a la selección de dichas colonias. Los clones seleccionados se denominaron Presuntos Clones Positivos.

En la figura 24 se ilustra un ejemplo de la proliferación de 35 Candidatos Interactores, en las condiciones selectivas de crecimiento a 37 °C de SD-glucosa y SD-galactosa que son determinantes para la evaluación de la interacción de los diferentes clones con Smad2Δ93 en la Prueba de Interacción. Los clones indicados en la tabla adyacente de la figura 24 satisfacen los criterios de selección, considerándose interacciones válidas y por tanto se seleccionaron como Presuntos Clones Positivos. En esta primera etapa de la búsqueda de moléculas que interaccionan con Smad2Δ93, se seleccionaron unos 300 Presuntos Clones Positivos.

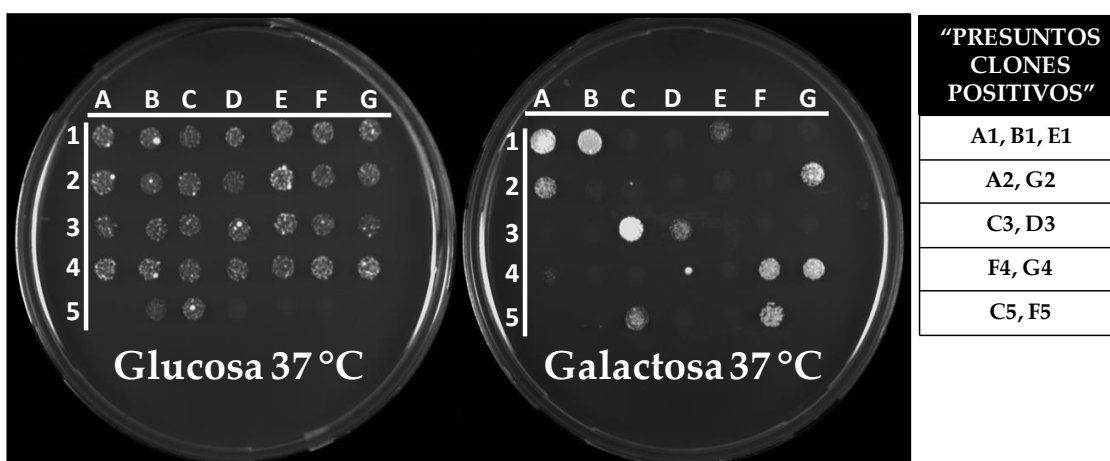


Figura 24. Proliferación de levaduras en la Prueba de Interacción. Las colonias de levadura procedentes de la selección en SD-galactosa a 37 °C (Candidatos Interactores) fueron replicadas en placas de SD-glucosa a 25 °C y posteriormente se cultivaron en SD-glucosa y SD-galactosa a 37 °C (Prueba de Interacción). Se ilustra la proliferación de las levaduras en las condiciones de SD-glucosa y SD-galactosa a 37 °C. En la tabla adyacente a la imagen se indican los Presuntos Clones Positivos seleccionados.

En el Sistema Doble Híbrido Cyto Trap® la intensidad de la interacción entre un clon determinado y la proteína cebo no es cuantificable. Por lo tanto, se evaluó ese grado de interacción por la densidad aparente del inóculo tras un tiempo de proliferación establecido tras la siembra. De esta manera, asumimos que el grado de proliferación de la levadura, medido como densidad aparente del inóculo, es proporcional al grado de interacción entre el clon candidato y la proteína cebo. Consideramos que a mayor grado de interacción entre dos proteínas, hay una mayor activación de la señalización de Ras y por lo tanto una mayor proliferación de la levadura. En nuestro caso, se le atribuyó un grado 5 a los clones que tenían la mayor densidad de proliferación en SD-galactosa (Figura 24 B1, C3), hasta un grado 1 a los que tenían la menor densidad de proliferación en SD-galactosa (Figura 24 D3, E1) en un intervalo de tiempo determinado.

III.1.3 Verificación de la interacción de los clones seleccionados.

Para verificar la interacción de Smad2 Δ 93 con los Presuntos Clones Positivos seleccionados, necesitamos aislar el DNA plasmídico presente en las levaduras *S. Cerevisiae* cdc25 α y co-transformarlo de nuevo con la construcción cebo. Se aisló DNA plasmídico de cada una de las colonias de *S. cerevisiae* seleccionadas. Posteriormente, la cepa de *E. coli* DH10B fue transformada con los diferentes DNAs plasmídicos purificados y dichas transformaciones fueron sembradas en placas de LB-agar con cloranfenicol (CAM) para seleccionar el plásmido pMyr. De cada una de las transformaciones se eligieron 6 colonias distintas. Para determinar la longitud del inserto de DNA, todos los plásmidos pMyr-Librería(PH) provenientes de cada una de las seis colonias de *E. coli* seleccionadas se digirieron con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI* (Figura 25). En el caso de las colonias donde todos los insertos de DNA mostraban una longitud similar, se seleccionaron dos clones (Figura 25, clon 2). En el caso de que el tamaño de los insertos de DNA fuera heterogéneo se seleccionó un plásmido representante de cada uno de los tamaños (Figura 25, clon 1). La selección de un representante de cada tamaño de inserto procedente de las levaduras que habían sido transformadas por más de un plásmido de la librería, como es el caso del clon 1, es

importante para poder establecer, en la posterior verificación, cuál de esos plásmidos produce la proteína responsable de la interacción con Smad2Δ93.

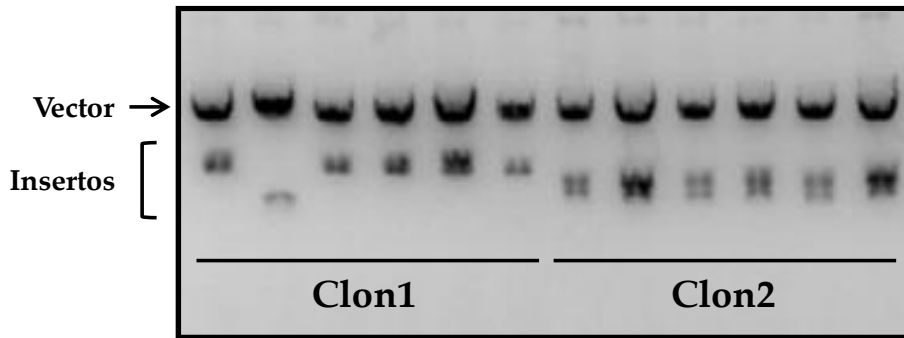


Figura 25. Análisis de restricción de dos Presuntos Clones Positivos. De cada uno de los Presuntos Clones Positivos seleccionados fue aislado el cDNA plasmídico, la cepa DH10B de *E. coli* fue transformada con cada uno de dichos plásmidos y finalmente se realizó un análisis de restricción con las enzimas *EcoRI* y *XhoI*. Se ilustra el análisis de restricción de dos clones distintos donde se analizaron 6 colonias diferentes provenientes de la transformación en *E. coli*.

De este análisis de restricción, se seleccionaron 876 cDNAs con los que se llevó a cabo la verificación de la interacción con la proteína cebo. Esta verificación es necesaria para descartar la posible activación de Ras por el propio clon fusionado a Myr o por una interacción directa entre el clon fusionado a Myr con la proteína Sos (Figura 26 B).

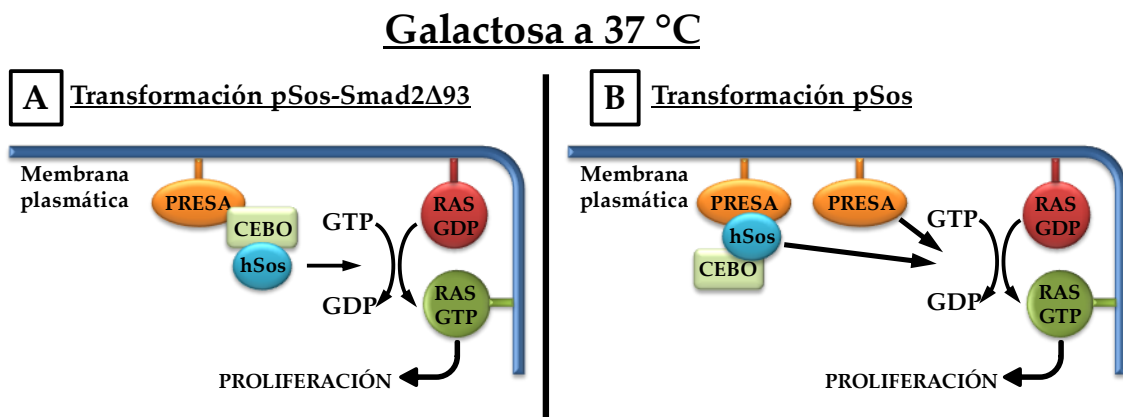


Figura 26. Prueba de Interacción realizada para la verificación de la interacción de los Presuntos Clones Positivos con pSos-Smad2Δ93. Se indican los dos tipos de co-transformaciones realizadas: clon fusionado a Myr y pSos-Smad2Δ93 (A), y clon fusionado a Myr y pSos (B). A. Cuando la proteína cebo interacciona con la proteína presa, hSos queda asociado a la membrana e induce la proliferación de la levadura. B. Mecanismos alternativos de estimulación de la proliferación que hay que descartar.

Levaduras *S. cerevisiae* *cdc25 α* fueron co-transformadas con cada uno de los cDNAs seleccionados (pMyr-Librería(PH)) y el plásmido que expresa la proteína de fusión pSos-Smad2 Δ 93 y se comparó con la co-transformación del mismo clon y el plásmido pSos (Figura 26). Cada una de las transformaciones fue realizada por duplicado. Las transformaciones fueron cultivadas en SD-glucosa a 25 °C y posteriormente fueron sometidas a una Prueba de Interacción, sembrándolas en las condiciones de cultivo SD-glucosa y SD-galactosa a 37 °C (Tabla 31). Los clones cuya proliferación fue dependiente de galactosa a temperatura restrictiva, y solamente se produjo en la transformación con pSos-Smad2 Δ 93 pero no en la transformación control, fueron seleccionados (Tabla 31, pMyr-Librería(PH)-1; Figura 26 A).

	pSos		pSos-Smad2 Δ 93	
	37 °C SD-GLUCOSA	37 °C SD-GALACTOSA	37 °C SD-GLUCOSA	37 °C SD-GALACTOSA
pMyr-Librería(PH)-1	-	-	-	+
pMyr-Librería(PH)-2	-	+	-	+

Tabla 31. Prueba de Verificación de la Interacción. Se ilustra un caso favorable y otro desfavorable en la verificación de la interacción. Se destaca en gris oscuro las condiciones requeridas para considerar la interacción entre el clon fusionado a pMyr y el pSos-Smad2 Δ 93 válida.

En la figura 27 se ilustra un ejemplo de proliferación de 10 Presuntos Clones Positivos en la Prueba de Interacción realizada para la verificación de su interacción con pSos-Smad2 Δ 93. En este ejemplo, sólo los clones 1, 2 y 7 satisfacen los criterios anteriormente expuestos (Tabla 31, pMyr-Librería(PH)-1). A los clones seleccionados tras la verificación los denominamos Clones Positivos Confirmados. De los 876 cDNAs analizados por su interacción con Smad2 Δ 93, 195 fueron seleccionados como Clones Positivos Confirmados pues cumplían con los criterios de selección expresados en la tabla 31. A estos 195 clones se les asignó un grado de interacción con Smad2 Δ 93 (Tabla 32). Los fragmentos seleccionados representan, por tanto, proteínas que interaccionan específicamente con Smad2 Δ 93 en el Sistema Doble Híbrido Cyto Trap®.

Cada Clon Positivo Confirmado fue secuenciado en sus primeros 400 nucleótidos por ambos extremos. Las secuencias así obtenidas se alinearon y

clasificaron utilizando el programa DNASTar SeqMan™ II y generaron 110 grupos de secuencia solapante que fueron entonces identificados utilizando la herramienta web Fasta de EMBL-EBI. Esta herramienta realiza una búsqueda por similitud de secuencia en una gran variedad de bases de datos (144). En este análisis se utilizó la base de datos EMBL Nucleotide Sequence Database. Todas las secuencias identificadas se pueden encontrar en la tabla 32. Se identificaron proteínas con gran diversidad de funciones. Así, podemos encontrar proteínas estructurales, quinasas, factores transcripcionales, NADH deshidrogenasas, desacetilasas de histonas, proteínas implicadas en el procesamiento del RNA y en el transporte nuclear, proteínas de membrana, ubiquitina-ligasas, proteínas implicadas en el ciclo celular, metiltransferasas, proteínas implicadas en la adhesión celular, etc. Algunas de las proteínas encontradas habían sido descritas previamente por su interacción física con Smad2, entre ellas, MAN1, Casein kinase I εpsilon (CKIε) y Ski interacting protein (SKIP), lo que nos da confianza de que el método utilizado estaba detectando proteínas que interaccionan con Smad2. También

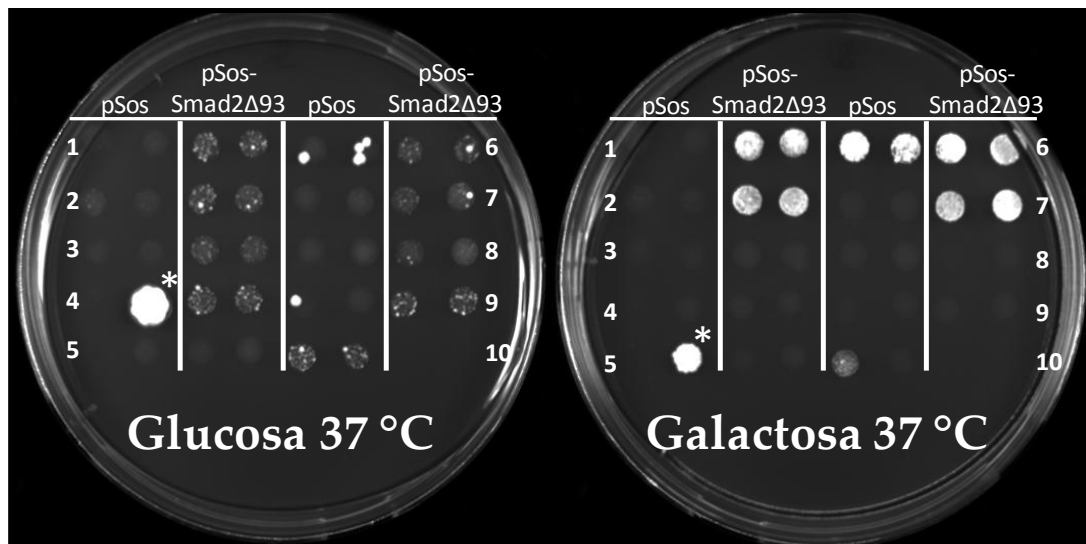


Figura 27. Proliferación de levaduras en la Prueba de Interacción para la verificación de su interacción con pSos-Smad2Δ93. Levaduras *S. cerevisiae* *cdc25α* fueron transformadas con cada uno de los cDNA seleccionados (pMyr-Librería(PH)) y co-transformadas con el plásmido que expresa la proteína de fusión pSos-Smad2Δ93 o con el plásmido pSos. Cada clon se ensayó por duplicado en cada una de las transformaciones (pSos-Smad2Δ93 y pSos). Dichas transformaciones fueron sembradas en SD-glucosa a 25 °C y posteriormente replicadas en las condiciones de cultivo SD-glucosa y SD-galactosa a 37 °C. Se ilustra la proliferación de las levaduras en las condiciones de SD-glucosa y SD-galactosa a 37 °C. Los diferentes Presuntos Clones Positivos ensayados se indican con la numeración del 1 al 10. *: Indica contaminación por hongos.

se encontraron proteínas previamente relacionadas con la ruta de señalización de TGF β : proteínas que interactúan con alguna de las Smads (RNF11), proteínas cuya expresión está regulada por TGF β (receptor ANP-A, ICAM1), proteínas susceptibles de ser fosforiladas tras la estimulación de dicha citoquina (HEF1), etc. (Tabla 32).

NOMBRE	Ref-Seq ID	FUNCIÓN	GRADO DE INTERACCIÓN	RELACIÓN CON TGF β *1
Proteasome subunit beta type 10	NM_002801	Implicado en proteosoma	5	-
Ankyrin repeat-containing protein (ANKRD11)	NM_013275	Regulación de la transcripción: implicado en reclutamiento de HDACs	5	-
Atrial natriuretic peptide receptor 1 (ANP-A)	NM_000906	Receptor con actividad guanilato ciclasa	5	SI (170)
Casein kinase I epsilon (CKIe)	NM_001894	Quinasa de caseínas	5	SI (171)
Heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	NM_002156	Chaperona mitocondrial	5	SI (172)
Ribosome-releasing factor 2, mitochondrial	NM_170681	GTPasa mitocondrial	5	-
Integral inner nuclear membrane protein MAN1	NM_014319	Transporte nuclear	5	SI (39, 173)
AF-9	NM_004529	Relacionado con leucemia	5	-
G protein-coupled receptor (GPR15)	NM_005290	Proteína transmembrana, receptor de quemocinas	5	-
Sprouty homolog 1 (SPRY-1)	NM_199327	Antagonista FGF	5	-
Fibronectin	NM_212482	Estructural. Adhesión celular	3;4;5	SI (174, 175)
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 2 (eIF4G) (p97)	NM_001172705	Regulador traduccional	2;5	-
Pulmonary surfactant-associated protein B (SP-B)	NM_198843	Proteína surfactante	2;5	SI (176)
NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2	NM_021074	NADH deshidrogenasa mitocondrial	2;4;5	-
Enhancer of filamentation 1 (HEF1)	NM_006403	Proteína de plegamiento. Relacionado con adhesión celular.	2;3;5	SI (177)
Ribonucleoproteína A1 (hnRNP A1)	NM_031157	Procesamiento del RNA	1;3;5	SI (178)
Heat shock 70kDa protein 5 (GRP-78)	NM_005347	Chaperona del Retículo Endoplasmático	4	SI (179)
Sirtuin1	NM_001142498	Desacetilasa de histonas	4	SI (50, 58)
Vigilin	NM_203346	Metabolismo lipídico	4	-
Major histocompatibility complex class II DR beta 3	NM_022555	Implicado en sistema inmune	4	-
Basic salivary proline-rich protein 4 (PRB4)	NM_002723	Proteína secretora salivar	4	-
Cytochrome P450 (CYP1A1)	NM_000499	Monooxigenasa. Implicado en transporte de electrones dependiente de NADH	4	SI (180)
Cytochrome P450 (CYP1A2)	NM_000761	Monooxigenasa. Implicado en transporte	4	SI (180)

		de electrones dependiente de NADH		
Translationally-controlled tumor protein	NM_003295	Unión de calcio y estabilización de microtúbulos	2;3;4	-
NADH dehydrogenase subunit 2	YP_003024027	NADH deshidrogenasa mitocondrial	3	-
Homo sapiens ankyrin repeat domain 46 (ANKRD46)	NM_198401	Proteína transmembrana función desconocida	3	-
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F (hnRNP) (Nucleolin-like protein mcs94-1).	NM_001098208	Procesamiento del RNA	3	-
Small nuclear ribonucleoprotein polypeptides B and B1 (snRNP-B)	NM_198216	Procesamiento del RNA	3	-
Heat shock 70kDa protein 6 (HSP70B)	NM_002155	Chaperona	3	SI (181)
Heat shock 27kDa protein 1 (HSPB1)	NM_001540	Chaperona involucrada en resistencia a estrés y organización de actina	3	SI (182)
Basic salivary proline-rich protein 3 (PRB3)	NM_006249	Proteína secretora salivar. Receptor de <i>F. nucleatum</i>	3	-
Immunoglobulin heavy constant gamma 1	147-100 *2 (OMIM ID)	Implicado en sistema inmune	3	-
Vasculin (GC-rich promoter binding protein 1)	NM_001203246	Factor de transcripción	3	-
Zinc finger and BTB domain containing 1	NM_001123329	Regulación de la transcripción	3	-
Myosin light chain kinase (MLCK)	NM_053031	Quinasa	3	-
Nuclear protein localization 4 homolog	NM_017921	Implicado en el transporte de proteínas no plegadas desde el retículo endoplasmático al citoplasma	3	-
Ubiquitin specific peptidase 9, X-linked (USP9X)	NM_001039590	Deubiquitinasa	3	-
Mitochondrial ribosomal protein L48	NM_016055	Proteína ribosómica	3	-
TFIIH basal transcription factor complex p44 subunit	NM_001515	Transcripción RNA	3	-
Pre-mRNA 3'-end-processing factor FIP1	NM_030917	Procesamiento de pre-mRNA3'	3	-
Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1)	NM_000201	Proteína de membrana. Ligando de LFA-1 (proteína adhesión de leucocitos)	3	SI (183)
PTK7 (protein tyrosine kinase 7)	NM_152882	Quinasa implicada en adhesión celular, migración y proliferación	3	-
Glutathione peroxidase 1 (GPX1)	NM_201397	Peroxidasa implicada en protección de hemoglobina	3	-
Ring finger protein 11 (RNF11)	NM_014372	Ubiquitinación y regulación transcripcional	3	SI (184)
Myosin-11 (Myosin heavy chain, smooth muscle isoform)	NM_002474	Cadena ligera reguladora de miosina	3	-
Chaperonin-containing TCP-1 beta subunit homolog	NM_001198842	Chaperona	3	-

BPI fold-containing family A member 1	NM_130852	Respuesta inflamatoria de las vías aéreas	3	-
SEC63	NM_007214	Translocación proteínas a través del retículo endoplasmático	3	-
Epidermal growth factor-like protein 6 (PP648)	NM_001167 890	Implicado en morfogénesis del folículo piloso	3	-
Cell division cycle 123 homolog (S. cerevisiae)	NM_006023	Ciclo celular	3	-
SNW domain-containing protein 1 (Ski-interacting protein)	NM_012245	Splicing factor	3	SI (185)
Plasma protease C1 inhibitor	NM_001032 295	Proteasa implicada en activación de complemento, coagulación y fibrinólisis	3	-
Sciellin	NM_144777	Ensamblaje o regulación de proteínas	3	-
Tyrosine-protein kinase FGR	NM_001042 747	Proteína tirosina quinasa no receptora	3	-
KIAA1377	NM_020802	No caracterizada	3	-
Heme-regulated initiation factor 2-alpha kinase (HRI)	NM_014413	Quinasa implicada en la inhibición de síntesis de proteínas	3	-
Focal adhesion kinase 1 (PTK2 protein tyrosine kinase 2)	NM_005607	Quinasa implicada en motilidad, proliferación y apoptosis	3	SI (186)
Complement C1r subcomponent	NM_001733	Proteasa implicada en el complemento	3	-
MHC class II DP3-alpha-1	NM_033554	Antígeno de susceptibilidad	3	-
14-3-3 protein zeta/delta	NM_003406	Proteína adaptadora implicada en numerosas vías de señalización	3	-
FERM, RhoGEF (ARHGEF) and pleckstrin domain protein	NM_001001 715	Factor intercambiador de guanina	3	-
Multiple ankyrin repeats single KH domain protein isoform 2	NM_017978	Proteína scaffold	3	-
Ribosomal protein L4	NM_000968	Proteína de unión a rRNA. Represor transcripcional y traduccional	3	-
Tyrosine-protein kinase Sgk269 (Sugen kinase 269)	NM_024776	Quinasa que interviene en migración	3	-
S100 calcium binding protein A6	NM_014624	Involucrado en señalización de calcio	3	-
Ferritin heavy chain	NM_002032	Ferroxidasa implicada en la homeostasis del hierro	3	-
LSM8 homolog, U6 small nuclear RNA associated	NM_016200	Estabilidad de U6 snRNA	3	-
C-C chemokine receptor type 2 (C-C CKR-2)	NM_001123 041	Receptor de quimiocinas	3	-
Actin-related protein 2, Arp2	NM_001005 386	Polimerización de actina	3	-
Histone-lysine N-methyltransferase SETDB1	NM_014159	Metiltransferasa de histonas	3	-
Microtubule-associated protein 7 (E-MAP-115)	NM_001198 617	Proteína estabilizadora de microtúbulos	3	-
Heat shock protein HSP 90-alpha	NM_001017 963	Chaperona	2,3	SI (179)
RNA polymerase II-associated	NM_001146	Implicada en unión de RNA polimerasa II	2,3	-

protein 3	076	con diferentes reguladores		
Histone deacetylase 6	NM_006044	Desacetilación de histonas	2;3	-
Myosin heavy chain 11	NM_002474	Contracción muscular	2;3	-
Keratin 8	NM_002273	Citoesqueleto del músculo estriado	1;3	SI (187)
Tyrosine-protein kinase Lyn	NM_001111 097	Tirosina quinasa	1;3	SI (188)
Vimentin	NM_003380	Proteína estructural. Filamentos intermedios	1;2;3	SI (189)
DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB9	NM_006233	Polimerasa de RNA	2	-
Pulmonary surfactant-associated protein C (SP-C)	NM_001172 410	Proteína surfactante	2	SI (190)
E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1 (ARF-BP1)	NM_031407	Ligasa de ubiquitina	2	-
Sodium channel and clathrin linker 1	NM_144643	Proteína adaptadora del canal de SCN10A	2	-
Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 2	NM_006141	Involucrada en unión de carga a dineina	2	-
Bromodomain containing 7 (BRD7)	NM_013263	Remodelamiento de cromatina. Activador señalización WNT	2	-
Cold-inducible RNA-binding protein (A18 hnRNP)	NM_001280	Estabilización transcritos implicados en supervivencia	2	-
i-beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase	NM_006876	Transferasa de grupos Nacetilglucosamina	2	-
Thioredoxin domain-containing protein 11 (EF-hand-binding protein 1)	NM_015914	Regulador redox	2	-
Apolipoprotein C-I	NM_001645	Metabolismo de ácidos grasos	2	-
Optineurin	NM_001008 211	Mantenimiento del complejo de Golgi	2	-
Zyxin	NM_003461	Proteína de adhesión plaquetaria	2	-
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit k (eIF3)	NM_013234	Implicada en la traducción	2	-
Heat shock transcription factor 2 (HSTF 2)	NM_001135 564	Implicada en la transcripción	2	-
Methionine adenosyltransferase 2 subunit beta	NM_013283	Síntesis de S-Adenosylmethionine	2	-
NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1 (NADH dehydrogenase subunit 1)	YP_0030240 26	NADH deshidrogenasa mitocondrial	2	-
Splicing factor 45 (RNA binding motif protein 17)	NM_001145 547	Splicing factor	2	-
Epithelial membrane protein 3 (EMP-3)	NM_001425	Implicado en proliferación celular e interacción célula-célula	2	-
Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus (Acinus)	NM_001164 817	Splicing factor	2	-

Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1	NM_175573	Receptor proteosomal de ubiquitina	2	-
Serine/arginine-rich splicing factor 10 (SRFS10)	NM_004593	Splicing factor	2	-
Signal recognition particle receptor subunit alpha (SR-alpha)	NM_001177 842	Receptor tirosin quinasa	2	-
U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM3	NM_014463	Estabilidad de U6 snRNA	2	-
Zinc finger and BTB domain containing protein 16	NM_001018 011	Factor de transcripción	1	-
cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4D (PDE43)	NM_001197 219	Metabolismo del AMPc	1	-
ETS-related transcription factor Elf-3	NM_004433	Factor de transcripción	1	-
PDZ and LIM domain 5	NM_001011 513	Involucrado en desarrollo del corazón	1	-
Heat shock 10kDa protein	NM_002157	Chaperona mitocondrial	1	-
DNA polymerase eta	NM_006502	Polimerasa de DNA involucrada en el daño al DNA	1	-
Cdc42-interacting protein 4 (CIP4)	NM_004240	Involucrado en endocitosis	1	-
Chondrosarcoma-associated protein 2 (TRAG-3)	NM_004909	Proteína relacionada con resistencia a drogas	1	-
Cysteine-rich protein 2 (CRP2)	NM_001312	No caracterizada	1	-

*1 RELACIÓN CON TGF β : Se refiere a proteínas que interactúan con alguna de las Smads, proteínas cuya expresión está regulada por TGF β , proteínas susceptibles de ser fosforiladas tras la estimulación de dicha citoquina etc.

*2 Se indica la referencia de OMIM ID por carecer de referencia Ref-Seq.

Tabla 32. Lista de los Clones Positivos Confirmados obtenidos. Se detalla nombre, Ref-Seq ID, función de la proteína, grado de interacción con Smad2 Δ 93 y relación previa con la señalización de TGF β . Los clones que contienen más de un grado de interacción es debido a que se obtuvieron diferentes clones de la misma proteína en el proceso de selección, teniendo cada clon asignado un grado de interacción diferente. Se destaca en gris oscuro la proteína seleccionada para proseguir el estudio en este trabajo.

Todas las proteínas obtenidas fueron sometidas a un análisis de agrupamiento funcional. Para ello, utilizamos DAVID (148), que provee un paquete de aplicaciones informáticas para la comprensión del significado biológico de un conjunto de genes, asociando grupos de genes a un significado o función biológica. El programa DAVID trabaja con IDs para evitar redundancias y duplicaciones de genes. Para cada grupo se especifica el valor pEASE (p-value), valor estadístico que indica si la asociación (enriquecimiento) de una lista de genes a una función dada es significativa y específica o por el contrario es al azar. Así, si el valor pEASE de un grupo de función es menor o igual a 0,01, la lista de genes está específicamente asociada a dicha función, por el

FUNCIÓN	pEASE	Nº DE GENES INCLUIDOS
Fosfoproteína	8,84E-09	66
Acetilación	3,88E-07	34
Respuesta a estrés	1,06E-06	7
Interacción virus-huésped	1,51E-05	10
Procesamiento de mRNA	5,52E-05	9
Splicing de mRNA	9,70E-05	8
Choque térmico	1,53E-04	3
Citoplasma	1,63E-04	33
Espliceosoma	3,72E-04	6
Unión RNA	4,29E-04	11
Proteínas inducidas por estrés	7,05E-04	3
Núcleo	7,89E-04	37
ATP	0,00131656	7
Chaperona molecular	0,00193214	3
Ribonucleoproteína	0,00304903	7
Dominio LIM	0,00570534	4
Chaperona	0,00871189	5
Nucleoproteína viral	0,00953831	3
Unión ATP	0,01693302	14
Proteína tirosina-quinasa	0,01914125	4
Unión nucleótido	0,02333772	16
Inhibidor síntesis de proteínas	0,02521873	2
Metaloproteína	0,02553219	4
Duplicación	0,02926351	5
Proto-oncogen	0,03008174	5
Metilación	0,03527518	5
Monooxigenasa	0,06011388	3
Quinasa	0,06169729	8
Adhesión celular	0,06458379	6
Conjugación Ubl	0,0798419	7
Unión isopeptido	0,08021152	5
Plasma	0,08159344	3
Dominio Sh3	0,09212391	4
Extremo amino terminal acetilado	0,092313	3
Heterodímero	0,09702698	3

Tabla 33. Agrupamiento funcional de los Clones Positivos Confirmados obtenidos. Se detalla función, valor pEASE y número de genes incluidos en dicha función. Valor pEASE menor o igual a 0,01 es un indicador de grupo/función significativa.

contrario, si el valor pEASE es mayor a 0,01 dicha asociación está asignada al azar y por lo tanto la relación no es significativa. Se realizó un análisis funcional utilizando la base de datos SP_PYR, que contiene la información de dos bases de datos de proteínas; Swiss-Prot (SP) y Protein Information Resource (PIR). La base de datos SP_PYR identificó 99 proteínas de las 110 obtenidas. El agrupamiento funcional de dicha lista reveló que las proteínas obtenidas están agrupadas en diferentes grupos funcionales (Tabla 33). Este análisis sugiere que Smad2 tiene tendencia a estar implicado con determinados grupos de proteínas funcionalmente relacionadas que presentan un valor de pEASE significativo (Tabla 33), entre las que se encuentran fosfoproteínas, proteínas implicadas en acetilación, respuesta a estrés, interacción virus-huesped, etc.

III.2. ¿Interaccionan Smad2 y Sirt1 en células eucarióticas?

Dentro del conjunto de clones detectados como proteínas que interaccionan con Smad2 Δ 93, encontramos una proteína llamada Sirtuina1 o Sirt1. Sirt1 es una desacetilasa de histonas de clase III dependiente de NAD⁺ que desacetila tanto histonas como proteínas no histónicas (100, 102). En el contexto de la ruta de señalización de TGF β , Smad7 es desacetilada en respuesta a TGF β , lo cual provoca su degradación vía proteosoma (48). Sirt1 es una de las desacetilasas implicadas en la desacetilación de Smad7 lo que permite la ubiquitinación mediada por Smurf1 y aumenta su degradación (50). Por otro lado, Smad2 y Smad3 son acetiladas en respuesta a TGF β (54, 55, 57). Dicha acetilación regula positivamente la actividad transcripcional de Smad2 y Smad3 dependiente de TGF β (54, 55, 57). Recientemente ha sido descrita la proteína Sirt1 como una desacetilasa para Smad3 (58).

Hasta el momento, no se conoce la proteína involucrada en la desacetilación de Smad2. La interacción de Sirt1 con Smad2, sugiere la posibilidad de que Sirt1 pudiera estar contribuyendo a la desacetilación de Smad2. De esta manera, Sirt1 podría ser un nuevo elemento regulador en la compleja vía de señalización de TGF β . Además de todo esto, en el análisis funcional realizado a la lista de clones seleccionados del Doble Híbrido, Sirt1 se encuentra en los grupos funcionales que engloban fosfoproteínas,

acetilación, interacción virus-huésped y proteínas nucleares, cuatro grupos funcionales que presentan un valor pEASE reducido. El hecho de que Sirt1 esté incluida en estos grupos funcionales con reducido valor pEASE nos da confianza en que Sirt1 sea un candidato interesante para estudiar su implicación en la ruta de señalización de TGF β .

Por todo lo anterior, decidimos investigar con más detalle la posible relación entre Sirt1 y la ruta de señalización del TGF β , prestando especial énfasis en su relación con Smad2.

III.2.1 Estudio de la interacción de Smad2-Sirt1 *in vivo*.

Realizamos un primer ensayo, utilizando la técnica de co-inmunoprecipitación, para determinar si Smad2 y Sirt1 interaccionan en un contexto celular eucariótico. Células HEK293T fueron co-transfectadas con HA-Sirt1 y Flag-Smad2. Tras 24 horas, las células fueron tratadas durante 14 horas con 2,5 μ M de TSA, un inhibidor de desacetilasas tipo I y II (56) o con DMSO como control. Finalmente, las células fueron estimuladas con 2 ng/ml de TGF β durante 1 hora. La inmunoprecipitación del epitopo Flag y posterior análisis mediante Western Blot reveló una interacción entre Flag-Smad2 y HA-Sirt1 que se incrementa ligeramente cuando estimulamos las células con TGF β (Figura 28 A, B). La inhibición con TSA de las desacetilasas tipo I y II, potencia de manera muy significativa la interacción entre Flag-Smad2 y HA-Sirt1. Además, en este caso se observa un incremento con el tratamiento de TGF β , aunque de menor cuantía que el producido en ausencia de TSA (Figura 28 A, B). La inmunoprecipitación control con un anticuerpo (IgG) de animal no inmunizado reveló una cantidad mucho menor de HA-Sirt1, lo que indica la especificidad de la interacción entre Flag-Smad2 y HA-Sirt1 (Figura 28 A). Estos datos apuntan a que Smad2 y Sirt1 interaccionan en células eucarióticas, incrementándose dicha interacción con el tratamiento con TGF β , y sugieren que esta interacción puede estar beneficiada por la acetilación de Smad2, puesto que la mayor acetilación de Smad2 por el tratamiento con TSA (54, 55) incrementa notablemente la interacción con Sirt1.

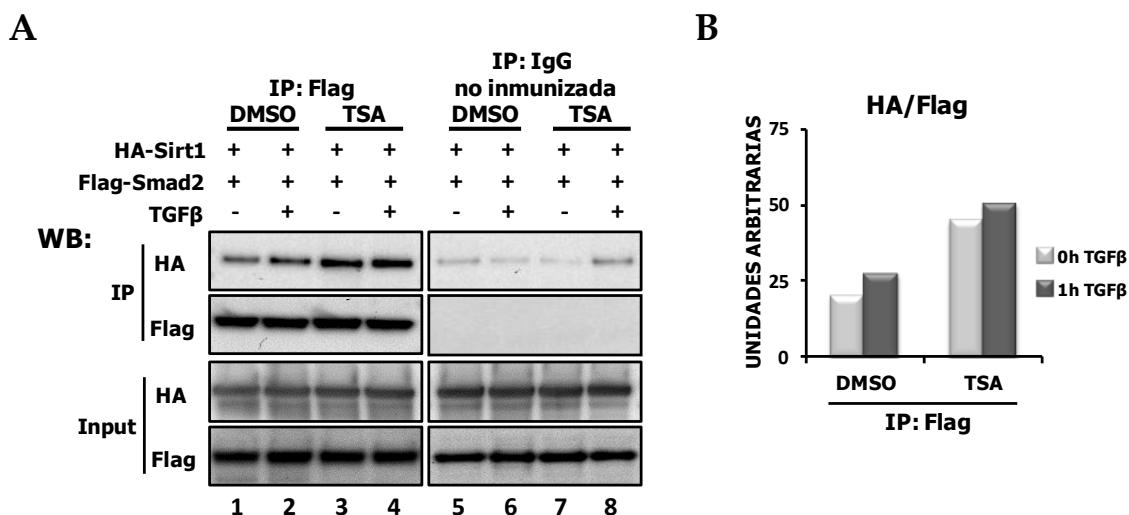


Figura 28. Smad2 y Sirt1 interaccionan *in vivo* en células HEK293T y esta interacción se incrementa con la estimulación con TGFβ. A. Células HEK293T fueron co-transfectadas con Flag-Smad2 y HA-Sirt1. Las células fueron tratadas durante 14 horas con 10 μM SB-431542 y o 2,5 μM TSA o DMSO como control. Al día siguiente el inhibidor fue lavado y las células fueron estimuladas durante 1 hora con 2 ng/ml de TGFβ. Flag-Smad2 fue purificada por inmunoprecipitación. Se realizó una inmunoprecipitación control con anticuerpos IgG de animal no inmunizado. HA-Sirt1 y Flag-Smad2 fueron detectadas por Western Blot. B. Cuantificación de los valores de HA-Sirt1 (líneas 1-4) corregidos con los valores de la inmunoprecipitación control (línea 5-8) y representados respecto a los valores de Flag-Smad2 (líneas 1-4). IP: Inmunoprecipitación, WB: Western Blot.

La línea celular de hepatoma humano Hep3B expresa Sirt1 (191) y ha sido usada en varios trabajos relacionados con esta proteína (191, 192). En Hep3B, Smad2 se acetila en respuesta a la estimulación con TGFβ (55). Estudiamos la interacción de Smad2 y Sirt1 en células Hep3B utilizando la técnica de co-inmunoprecipitación. El tratamiento con TSA potencia la interacción entre Smad2 y Sirt1 en células HEK293T (ver figura 28) e incrementa la acetilación de Smad2 (54, 55). La unión de Sirt1 a otros sustratos, por ejemplo p53, incrementa cuando el sustrato está activado y acetilado (193). Es posible que el proceso de acetilación de Smad2, en respuesta a TGFβ, tenga repercusión en la interacción de Sirt1 con Smad2. Por lo tanto, células Hep3B fueron co-transfectadas con HA-Sirt1 y Flag-Smad2 o EF-Flag y, 24 horas después, las células fueron sometidas a condiciones de TSA y reducción de suero para favorecer el estado acetilado de Smad2 (55); las células fueron privadas de suero toda la noche y posteriormente fueron tratadas con 2,5 μM de TSA 8 horas antes de ser estimuladas con 2 ng/ml de TGFβ durante 1 y 2 horas. La inmunoprecipitación con el anticuerpo

contra Smad2 y el posterior análisis mediante Western Blot reveló un incremento de la interacción entre HA-Sirt1 y Flag-Smad2 al estimular las células con TGFβ. Al igual que en la línea celular HEK293T, HA-Sirt1 y Flag-Smad2 interactúan en condiciones basales (Figura 29 A, B).

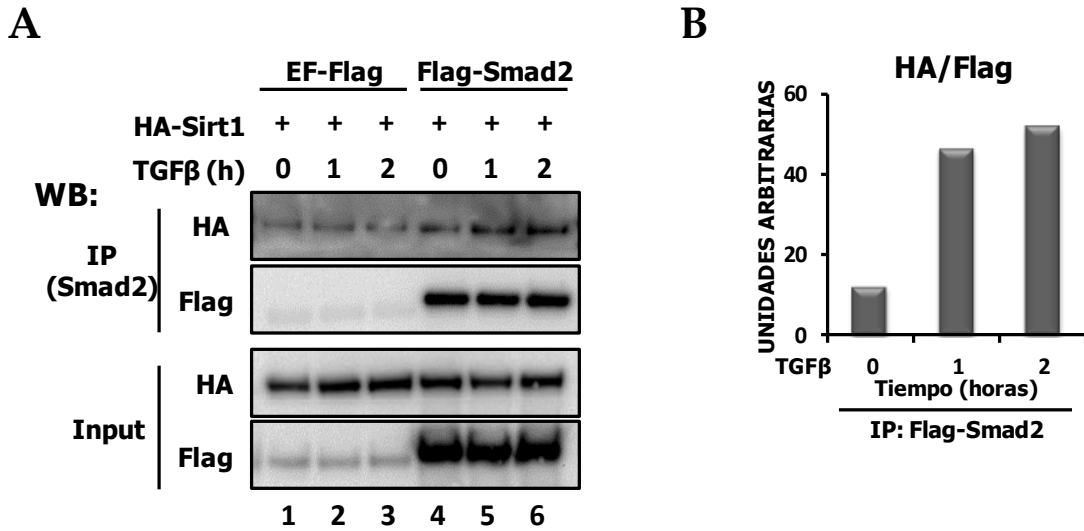


Figura 29. Smad2 y Sirt1 interactúan *in vivo* en células Hep3B y esta interacción se incrementa con la estimulación con TGFβ. A. Células Hep3B fueron co-transfectadas con HA-Sirt1 y Flag-Smad2 o EF-Flag. 24 horas después de la transfección, las células fueron privadas de suero toda la noche y posteriormente tratadas con 2,5 μM de TSA 8 horas antes de ser estimuladas con 2 ng/ml de TGFβ durante 1 y 2 horas. Smad2 fue purificada por inmunoprecipitación. HA-Sirt1 y Flag-Smad2 fueron detectadas por Western Blot. B. Cuantificación de los valores de HA-Sirt1 (líneas 4-6) corregidos con los valores de la inmunoprecipitación control (líneas 1-3) y representados respecto a los valores de Flag-Smad2 (líneas 4-6). IP: Inmunoprecipitación, WB: Western Blot.

III.2.2 Estudio de la interacción entre Sirt1 y Smad2 endógenas.

Estudiamos la interacción de Smad2 y Sirt1 endógenas en células Hep3B. El proceso de acetilación de Smad2 inducido en respuesta a TGFβ podría tener repercusión en la interacción de Sirt1 con Smad2, por lo tanto, células Hep3B fueron sometidas a condiciones de TSA y reducción de suero (ver apartado III.2.1) y posteriormente fueron estimuladas con 2 ng/ml de TGFβ durante 1 y 2 horas. Se realizó la inmunoprecipitación de las muestras con un anticuerpo contra Smad2 y otra control con un anticuerpo (IgG) de animal no inmunizado. Tras la inmunoprecipitación, se analizó la presencia de Sirt1 por Western Blot (Figura 30 A). El análisis de los niveles

de Sirt1 reveló que Smad2 interacciona con Sirt1 y esta interacción aumenta con la estimulación de las células con TGF β (Figura 30 A, B).

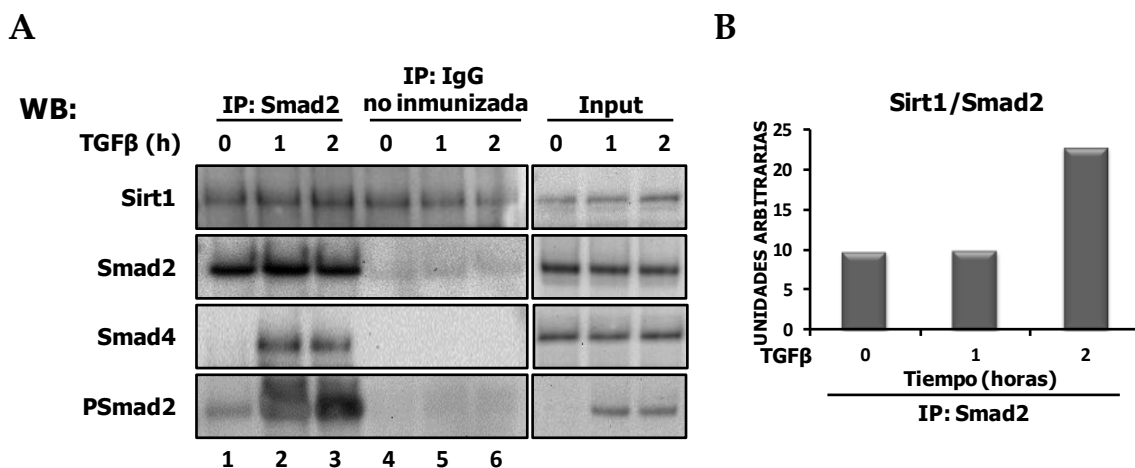


Figura 30. En células Hep3B, la interacción entre Smad2 y Sirt1 endógenas incrementa en respuesta a la estimulación con TGF β . A. Células Hep3B fueron privadas de suero toda la noche y posteriormente tratadas con 2,5 μ M de TSA 8 horas antes de ser estimuladas con 2 ng/ml de TGF β durante 1 y 2 horas. Smad2 fue purificada por inmunoprecipitación. Se realizó una inmunoprecipitación control con IgG de animal no inmunizado. Sirt1, Smad2, Smad4 y Smad2 fosforilada fueron detectadas por Western Blot. B. Cuantificación de los valores de Sirt1 (líneas 1-3) corregidos con los valores de la inmunoprecipitación control (líneas 4-6) y representados respecto a los valores de Smad2 (líneas 1-3). IP: Inmunoprecipitación, WB: Western Blot.

III.3. ¿Tiene Sirt1 algún efecto sobre la acetilación de Smad2?

Sirt1 es una desacetilasa de histonas y proteínas no histónicas tales como factores de transcripción, proteínas de señalización y enzimas (90). Además, en respuesta a TGF β , Smad2 es acetilada por CBP/p300 y PCAF incrementando su actividad transcripcional (54, 55). En nuestro laboratorio hemos determinado que Sirt1 interacciona con Smad2, sugiriendo la posibilidad de que Sirt1 pudiera estar desacetilando a Smad2. Por esta razón, decidimos estudiar el efecto de Sirt1 sobre la acetilación de Smad2.

III.3.1 Estudio de la acetilación de Smad2 en respuesta a TGFβ en células Hep3B.

Determinamos en nuestro laboratorio el efecto de la estimulación con TGFβ sobre la acetilación de Smad2 en la línea celular Hep3B. Para realzar dicha acetilación, células Hep3B fueron sometidas a condiciones de TSA y reducción de suero (ver apartado III.2.1) y posteriormente fueron estimuladas con 2 ng/ml de TGFβ durante 1 y 2 horas. Los extractos proteicos fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo contra Smad2 o con un anticuerpo (IgG) de animal no inmunizado como control. Posteriormente, se analizó la acetilación de Smad2 mediante Western Blot (Figura 31 A). La cuantificación y posterior análisis de los datos confirmaron que en la línea celular Hep3B, Smad2 incrementa su acetilación en respuesta a TGFβ (Figura 31 A, B).

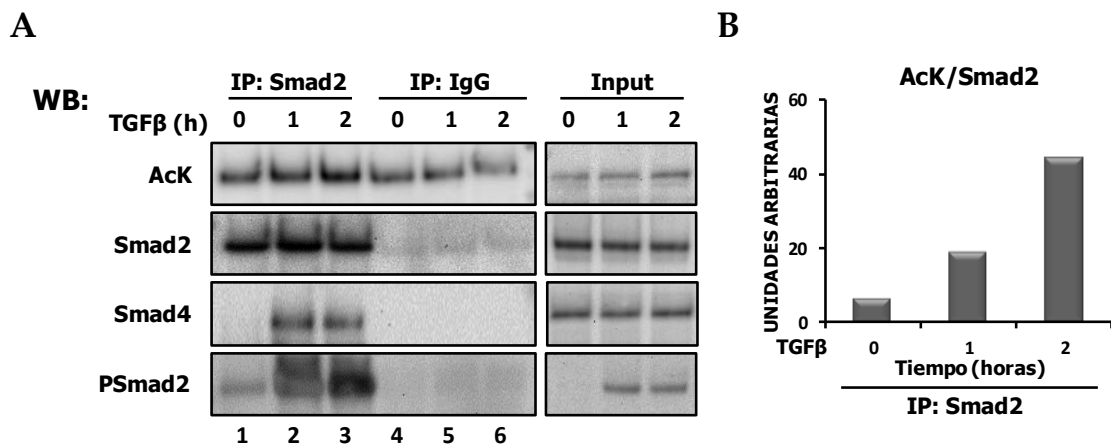


Figura 31. Smad2 incrementa su acetilación en respuesta a TGFβ en células Hep3B. A. Células Hep3B fueron privadas de suero toda la noche, posteriormente tratadas con 2,5 μM de TSA 8 horas antes de ser estimuladas con 2 ng/ml de TGFβ durante 1 y 2 horas. Smad2 fue purificada por inmunoprecipitación. Se realizó una inmunoprecipitación control en paralelo con IgG de animal no inmunizado. Acetil lisina (AcK), Smad2, Smad4 y Smad2 fosforilada fueron detectadas por Western Blot. B. Cuantificación de los valores de acetil lisina (AcK) (líneas 1-3) corregidos con los valores de la inmunoprecipitación control (líneas 4-6) y representados respecto a los valores de Smad2 (líneas 1-3). IP: Inmunoprecipitación, WB: Western Blot.

III.3.2 ¿Se acetila Smad2 transfectado en respuesta a TGFβ?

Hemos determinado que Smad2 transfectado se une a Sirt1 en células Hep3B en respuesta a TGFβ (ver apartado III.2.1). Estudiamos si Smad2 transfectado en células

Hep3B se acetila en respuesta al tratamiento con TGFβ. Células Hep3B fueron co-transfectadas con HA-Sirt1 y Flag-Smad2 o EF-Flag. Tras 24 horas, las células fueron sometidas a condiciones de TSA y reducción de suero (ver apartado III.2.1) y posteriormente fueron estimuladas con 2 ng/ml de TGFβ durante 1 y 2 horas. La inmunoprecipitación con el anticuerpo contra Smad2 y el posterior análisis mediante Western Blot, reveló la existencia de un nivel basal de Smad2 acetilada que se incrementa tras la estimulación con TGFβ (Figura 32 A, B). Además, el análisis con el anticuerpo anti HA reveló que HA-Sirt1 está unido a Flag-Smad2 en condiciones basales y su unión se incrementa tras la estimulación con TGFβ (Figura 32 A, C). Estos datos muestran que Flag-Smad2 es acetilada en células Hep3B en respuesta a TGFβ y que existe una correlación positiva entre la estimulación con TGFβ, acetilación de Flag-Smad2 e interacción con HA-Sirt1.

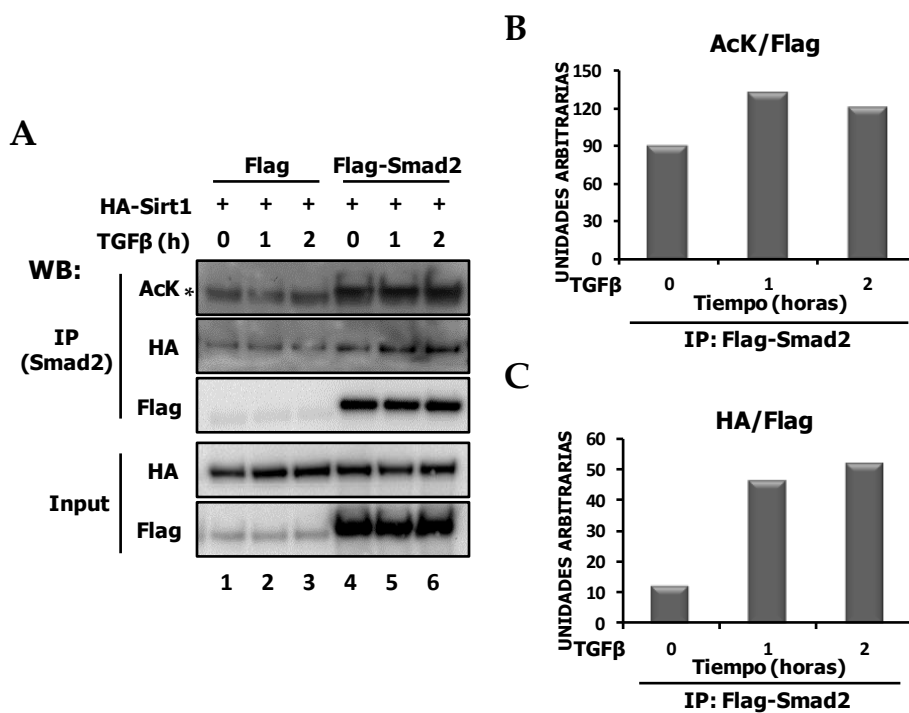


Figura 32. La estimulación con TGFβ incrementa la acetilación de Smad2 y su unión a Sirt1 en células Hep3B. A. Células Hep3B fueron co-transfectadas con HA-Sirt1 y Flag-Smad2 o EF-Flag. Tras 24 horas, las células fueron privadas de suero toda la noche y posteriormente tratadas con 2,5 μM de TSA 8 horas antes de ser estimuladas con 2 ng/ml de TGFβ durante 1 y 2 horas. Smad2 fue purificada por inmunoprecipitación. Acetil lisina (AcK), HA-Sirt1 y Flag-Smad2 fueron detectadas por Western Blot. B. Cuantificación de los valores de acetil lisina (AcK) (líneas 4-6) representados respecto a los valores de Flag-Smad2 (líneas 4-6). C. Cuantificación de los valores de HA-Sirt1 (líneas 4-6) corregidos con los valores de la inmunoprecipitación control (líneas 1-3) y representados respecto a los valores de Flag-Smad2 (líneas 4-6). IP: Inmunoprecipitación, WB: Western Blot. *: Banda inespecífica de reacción cruzada con el anticuerpo contra AcK que se desestimó en el proceso de cuantificación.

III.3.3 ¿Afecta la actividad desacetilasa de Sirt1 a la acetilación de Smad2?

Para estudiar si la actividad desacetilasa de Sirt1 afecta a la acetilación de Smad2, generamos un mutante dominante negativo de Sirt1, denominado Sirt1H363Y, que carece de actividad catalítica (105). La mutación consiste en la sustitución del residuo de histidina 363 por uno de tirosina y fue generado en dos versiones: HA-Sirt1H363Y y Flag-Sirt1H363Y (Figura 33 A, B).

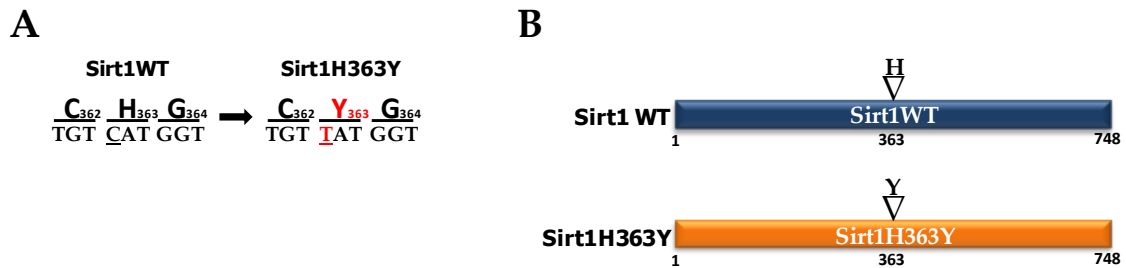


Figura 33. Generación del mutante Sirt1H363Y por mutagénesis dirigida. A. Cambio de nucleótido producido en el mutante Sirt1H363Y (rojo). B. Posición de la mutación H363Y en Sirt1.

Estudiamos el efecto de sobreexpresión de la proteína Sirt1 silvestre (Sirt1WT) y del mutante Sirt1H363Y sobre la acetilación de Flag-Smad2. Células Hep3B fueron co-transfectadas con Flag-Smad2/HA-Sirt1WT o Flag-Smad2/HA-Sirt1H363Y y comparadas con células control transfectadas con EF-Flag/HA-Sirt1WT o EF-Flag/HA-Sirt1H363Y o Flag-Smad2/EF-XC. Tras 24 horas, las células fueron sometidas a condiciones de TSA y reducción de suero (ver apartado III.2.1) y posteriormente fueron estimuladas con 2 ng/ml de TGFβ durante 1 hora. La inmunoprecipitación con el anticuerpo contra Smad2/Smad3 y el posterior análisis mediante Western Blot, reveló niveles similares de Flag-Smad2 acetilada tanto en las muestras donde no hay Sirt1 sobreexpresada como en la que sobreexpresan HA-Sirt1WT o HA-Sirt1H363Y (Figura 34 A, B). Estos datos muestran que el estado de acetilación de Flag-Smad2 no se afecta en presencia de HA-Sirt1, lo que sugiere que Sirt1 no está involucrada en la desacetilación de Smad2.

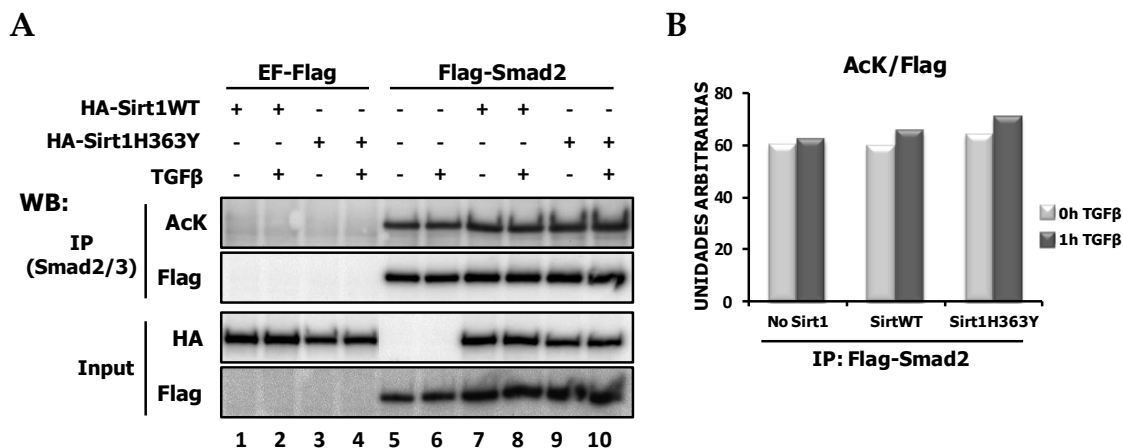


Figura 34. Sirt1 no está involucrada en la desacetilación de Smad2 en células Hep3B. A. Células Hep3B fueron co-transfectadas con Flag-Smad2/HA-Sirt1WT o Flag-Smad2/HA-Sirt1H363Y y comparadas con células transfectadas con los controles: EF-Flag/HA-Sirt1WT o EF-Flag/HA-Sirt1H363Y o Flag-Smad2/EF-XC. Las células fueron privadas de suero toda la noche, posteriormente tratadas con 2,5 μ M de TSA 8 horas antes de ser estimuladas con 2 ng/ml de TGF β durante 1 hora. Smad2/3 fue purificada por inmunoprecipitación. Acetil lisina (AcK), Flag-Smad2, HA-Sirt1 y HA-Sirt1H363Y fueron detectadas por Western Blot. B. Cuantificación de los valores de acetil lisina (AcK) (líneas 5-10) representados respecto a los valores de Flag-Smad2 (líneas 5-10). IP: Inmunoprecipitación, WB: Western Blot.

III.4. Estudio molecular de la interacción de Sirt1 y Smad2.

III.4.1 Efecto de la acetilación de Smad2 en la interacción Smad2/Sirt1.

Smad2 es acetilada por p300/CBP y P/CAF (54, 55). TGF β promueve la acetilación mediada por p300 en los residuos de lisina 19, 20 y 39 del dominio MH1 de Smad2 (55). Dicha acetilación no afecta ni a la estabilidad, ni a la oligomerización con Smad4 ni a la habilidad de unión al DNA de Smad2. Sin embargo, promueve la acumulación nuclear de Smad2 al decrecer su exportación nuclear. Además, dicha acetilación es necesaria para la activación transcripcional de Smad2 dependiente de TGF β (55).

Nuestros datos previos muestran que la acetilación de Smad2, al igual que su unión con Sirt1, es potenciada por la estimulación con TGF β (ver apartado III.3.2). Para estudiar la implicación de la acetilación de los residuos de lisina 19, 20 y 39 de Smad2

en su interacción con Sirt1, generamos dos mutantes de Smad2. En uno de ellos, llamado Flag-Smad2K19,20,39R, sustituimos los residuos de lisina 19, 20 y 39 de Smad2 por residuos de arginina. El residuo de arginina presenta la misma carga positiva que el aminoácido lisina, pero no es susceptible de ser acetilado (55) (Figura 35 A, B). En el segundo mutante sustituimos los residuos de lisina 19, 20 y 39 de Smad2 por residuos de glutamina. A este mutante lo llamamos Flag-Smad2K19,20,39Q. Este cambio genera una carga neutra que funcionalmente es similar a la acetilación de un residuo de lisina (55) (Figura 35 A, B).

El uso de mutantes en los residuos susceptibles de ser acetilados, nos da la posibilidad de conocer el efecto de dicha modificación en la interacción entre Sirt1 y Smad2, especialmente en la línea celular HEK293T, donde la acetilación Smad2 en respuesta a TGFβ es débil sin la sobreexpresión de p300 (54, 55).

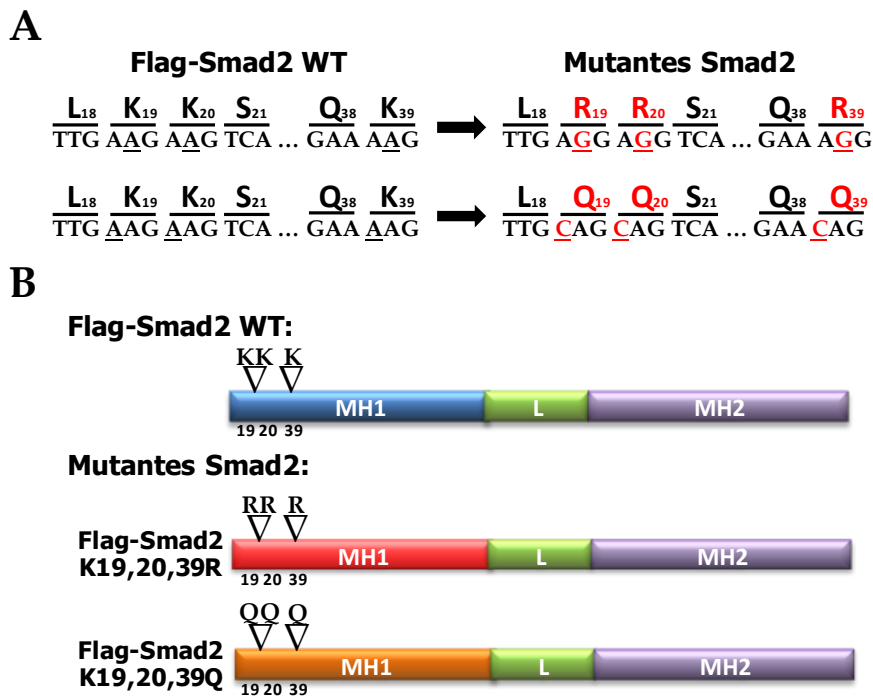


Figura 35. Generación de los mutantes Flag-Smad2K19,20,39R y Flag-Smad2K19,20,39Q por mutagénesis dirigida. A. Cambios de nucleótidos producidos en los mutantes Flag-Smad2K19,20,39R y Flag-Smad2K19,20,39Q (rojo). B. Posición de las mutaciones K19,20,39R y K19,20,39Q en Flag-Smad2.

Estudiamos el efecto de estas mutaciones de Smad2 en su interacción con Sirt1. Células HEK293T fueron co-transfectadas con HA-Sirt1 y Flag-Smad2 silvestre (WT) o

Flag-Smad2K19,20,39R o Flag-Smad2K19,20,39Q o EF-Flag. Tras 24 horas, las células fueron estimuladas con 2 ng/ml de TGF β durante 1 hora. La inmunoprecipitación del epítipo Flag y el posterior análisis mediante Western Blot reveló que la interacción entre Sirt1 y el mutante Smad2K19,20,39Q se incrementa respecto a la interacción detectada con Flag-Smad2WT (Figura 36 A, B). Sin embargo, el cambio de residuos K19,20,39R no afecta la interacción con Sirt1 respecto a la proteína silvestre (Figura 36 A, B). Estos datos sugieren que la interacción entre Sirt1 y Smad2 es potenciada por la acetilación de Smad2.

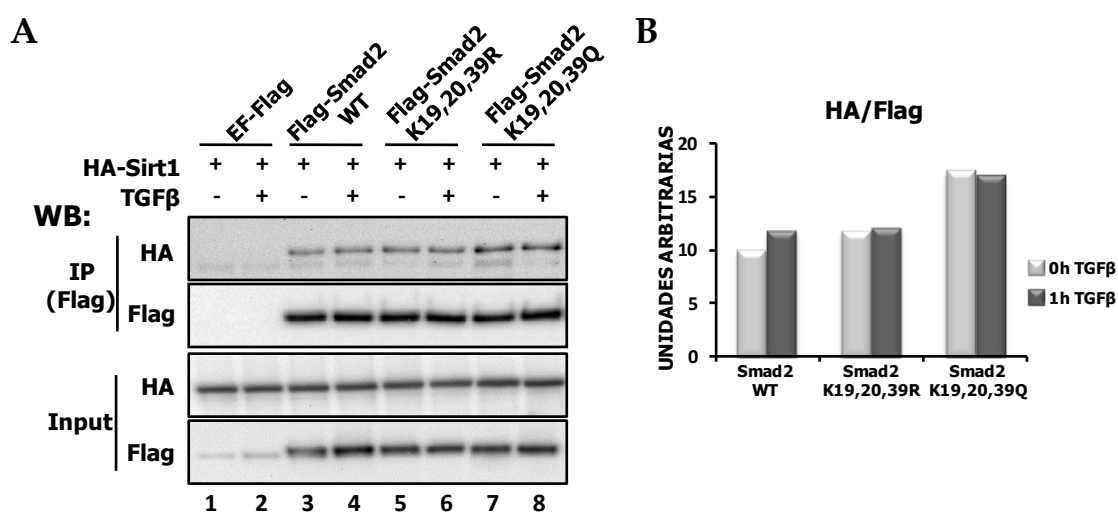


Figura 36. La interacción de Sirt1 con Smad2 se potencia con la mutación K->Q en los residuos de lisina 19, 20 y 39 de Smad2. A. Células HEK293T fueron co-transfectadas con HA-Sirt1 y Flag-Smad2WT o Flag-Smad2K19,20,39R o Flag-Smad2K19,20,39Q o EF-Flag. Las células fueron tratadas con 10 μ M SB-431542 durante toda la noche. Al día siguiente el inhibidor fue lavado y las células fueron estimuladas con 2 ng/ml de TGF β durante 1 hora. La proteína Flag-Smad2WT y las diferentes proteínas mutantes para Smad2 fueron purificadas por inmunoprecipitación. HA-Sirt1, Flag-Smad2WT y los mutantes de Smad2 fueron detectados por Western Blot. B. Cuantificación de los valores de HA-Sirt1 (líneas 3-8) representados respecto a los valores de Flag-Smad2WT, Flag-Smad2K19,20,39R y Flag-Smad2K19,20,39Q (líneas 3-4, 5-6 y 7-8, respectivamente). IP: Inmunoprecipitación, WB: Western Blot.

III.4.2 Efecto de la actividad desacetilasa de Sirt1 sobre la interacción Smad2/Sirt1.

Nuestros experimentos muestran que Sirt1 no desacetila a Smad2 (ver apartado III.3), aun así no descartamos la posibilidad de que la función desacetilasa de Sirt1 pudiera influir en su interacción con Smad2. Células Hep3B fueron co-transfectadas

con HA-Sirt1WT y Flag-Smad2 o EF-Flag, o co-transfectadas con HA-Sirt1H363Y y Flag-Smad2 o EF-Flag. Hemos visto que la acetilación de Smad2 en respuesta a TGFβ influye en su interacción con Sirt1 (ver apartado III.4.1). Por lo tanto, 24 horas después de la transfección, células Hep3B fueron sometidas a condiciones de TSA y reducción de suero (ver apartado III.2.1) y posteriormente fueron estimuladas con 2 ng/ml de TGFβ durante 1 hora. La inmunoprecipitación con el anticuerpo contra Smad2/Smad3 y el posterior análisis mediante Western Blot reveló una interacción entre Flag-Smad2 y HA-Sirt1WT que se incrementa con la presencia de TGFβ (Figura 37 A, B). Sin embargo, la unión entre Flag-Smad2 y la versión sin actividad catalítica de Sirt1 (HA-Sirt1H363Y) es considerablemente menor y no varía con la estimulación con TGFβ (Figura 37 A, B). Estos datos sugieren que la actividad catalítica de Sirt1 es importante para su interacción con Smad2, tanto en condiciones de reposo como de estimulación con TGFβ.

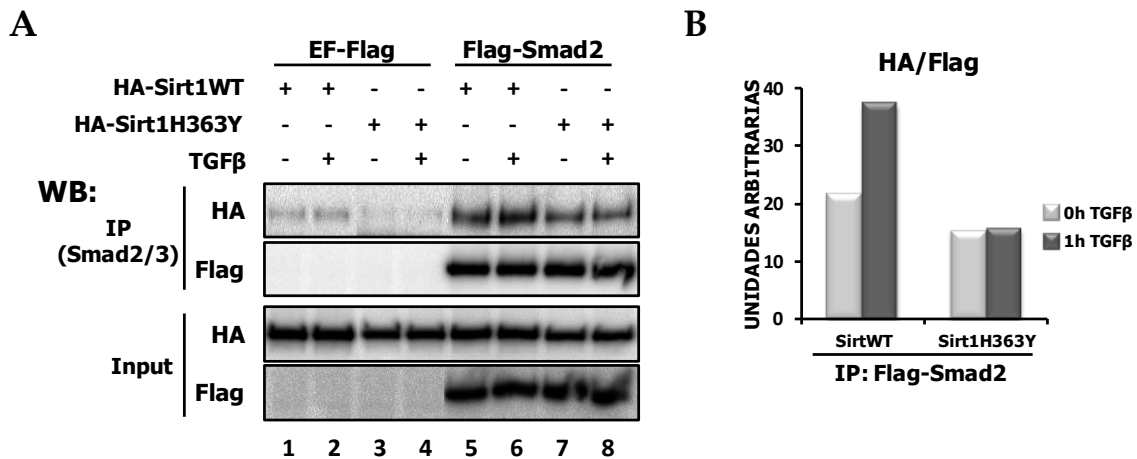


Figura 37. La actividad catalítica de Sirt1 es importante para su interacción con Smad2. A. Células Hep3B fueron co-transfectadas con HA-Sirt1WT y Flag-Smad2 o EF-Flag, o co-transfectadas con HA-Sirt1H363Y y Flag-Smad2 o EF-Flag. 24 horas después de la transfección, las células fueron privadas de suero toda la noche y posteriormente tratadas con 2,5 μM de TSA 8 horas antes de ser estimuladas con 2 ng/ml de TGFβ durante 1 hora. Smad2/3 fue purificada por inmunoprecipitación. HA-Sirt1WT, HA-Sirt1H363Y y Flag-Smad2 fueron detectadas por Western Blot. B. Cuantificación de los valores de HA-Sirt1WT y HA-Sirt1H363Y (líneas 5-6 y 7-8, respectivamente) corregidos con los valores de la inmunoprecipitación control (líneas 1-2 y 3-4, respectivamente) y representados respecto a los valores de Flag-Smad2 (líneas 5-8). IP: Inmunoprecipitación, WB: Western Blot.

III.4.3 Efecto de la fosforilación de Smad2 sobre la interacción Smad2/Sirt1.

TGF β induce la fosforilación de Smad2 en los residuos de serina 465 y 467 del extremo carboxilo de la proteína (41, 42). La fosforilación de Smad2 provoca cambios conformacionales que permiten su disociación de los receptores tipo I de TGF β y la formación de complejos triméricos con Smad4 con capacidad de activación transcripcional (19).

La estimulación con TGF β potencia la interacción de Smad2 con Sirt1 (ver apartado III.2). Quisimos evaluar el efecto de la fosforilación de Smad2 en su interacción con Sirt1. Para ello, generamos el mutante llamado Flag-Smad2AAMA, que contiene una sustitución de los residuos de serina 464, 465 y 467 por alanina, lo que impide que pueda ser fosforilado en respuesta a TGF β (41, 42) (Figura 38 A, B). Para determinar si el mutante Flag-Smad2AAMA generado se fosforila en respuesta a TGF β , células HEK293T fueron transfectadas con Flag-Smad2WT o Flag-Smad2AAMA y, 24 horas después, las células fueron estimuladas con 2 ng/ml de TGF β durante 1 hora. El análisis mediante Western Blot reveló que el mutante Flag-Smad2AAMA que habíamos generado no se fosforila en respuesta a TGF β (Figura 38 C).

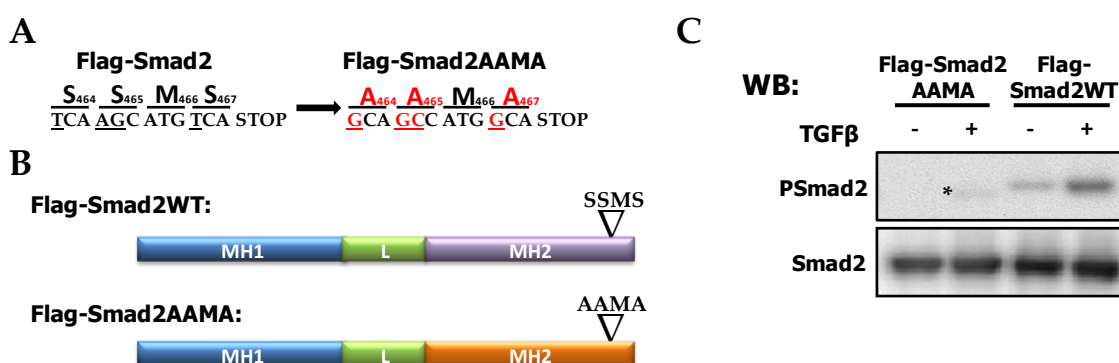


Figura 38. Generación de un mutante Flag-Smad2AAMA por mutagénesis dirigida que no se fosforila en respuesta a TGF β . A. Cambios de nucleótidos producidos en el mutante Flag-Smad2AAMA (en rojo). B. Posición de la mutación AAMA en Flag-Smad2. C. Células HEK293T fueron co-transfectadas con Flag-Smad2WT o Flag-Smad2AAMA. Las células fueron tratadas con 10 μ M SB-431542 durante toda la noche. Al día siguiente el inhibidor fue lavado y las células fueron estimuladas durante 1 hora con 2 ng/ml de TGF β . La fosforilación de Smad2 y la proteína Smad2 fueron detectadas por Western Blot. WB: Western Blot. *: Banda de fosforilación de Smad2 endógeno.

Utilizando este mutante, estudiamos si la fosforilación de Smad2 es necesaria para la interacción de Smad2 y Sirt1. Células HEK293T fueron co-transfectadas con HA-Sirt1 y Flag-Smad2WT o Flag-Smad2AAMA o EF-Flag. Tras 24 horas, las células fueron estimuladas con 2 ng/ml de TGFβ durante 1 hora. El extracto proteico fue inmunoprecipitado para el epitopo Flag y posteriormente fue analizado por Western Blot. Los resultados muestran que HA-Sirt1 se une al mutante Flag-Smad2AAMA tanto en ausencia o en presencia de TGFβ. La interacción del citado mutante con Sirt1 es mayor que la encontrada con Flag-Smad2WT (Figura 39). Estos datos indican que la fosforilación de Smad2 no es necesaria para la interacción de Sirt1 con Smad2 y sugieren una preferencia de unión de Sirt1 a Smad2 no fosforilada.

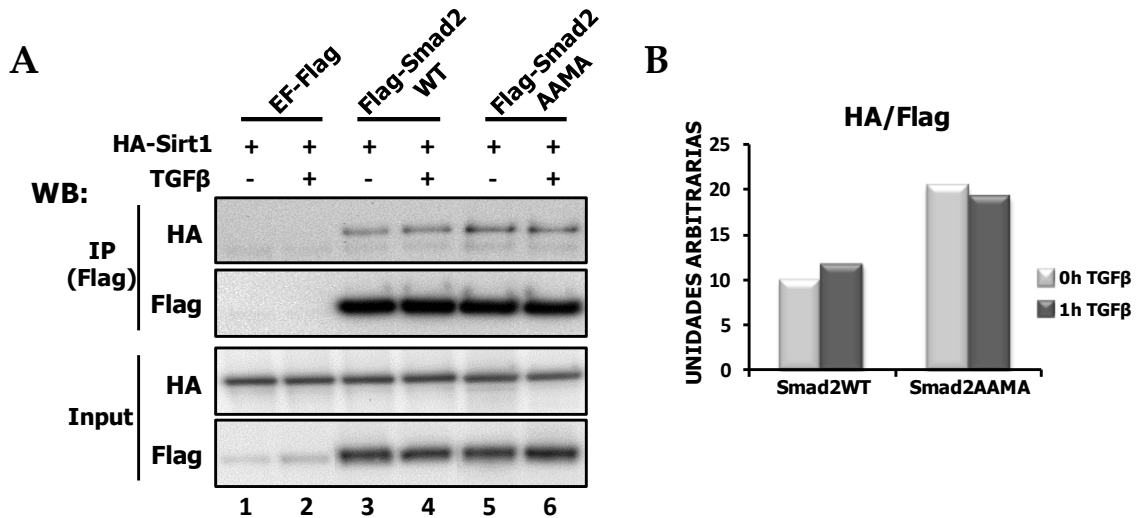


Figura 39. La fosforilación de Smad2 no es necesaria para la interacción de Sirt1 con Smad2. A. Células HEK293T fueron transfectadas con HA-Sirt1 y co-transfectadas con EF-Flag, Flag-Smad2WT o Flag-Smad2AAMA. Las células fueron tratadas con 10 μM SB-431542 durante toda la noche. Al día siguiente el inhibidor fue lavado y las células fueron estimuladas durante 1 hora con 2 ng/ml de TGFβ. Flag-Smad2WT y Flag-Smad2AAMA fueron purificadas por inmunoprecipitación. HA-Sirt1, Flag-Smad2WT y Flag-Smad2AAMA fueron detectadas por Western Blot. B. Cuantificación de los valores de HA-Sirt1 (líneas 3-6) representados respecto a los valores de Flag-Smad2WT y Flag-Smad2AAMA (líneas 3-4 y 5-6, respectivamente). IP: Inmunoprecipitación, WB: Western Blot.

III.4.4 Sirt1 tiene más afinidad por la forma no fosforilada pero acetilada de Smad2.

Hemos visto que la mutación de residuos que impiden la fosforilación dependiente de TGF β en Smad2 potencia la interacción entre Sirt1 y Smad2 (ver apartado III.4.3). Además, la mutagénesis de los residuos de lisina 19, 20 y 39 de Smad2 que mimetizan la acetilación también incrementa su interacción con Smad2 (ver apartado III.4.1). Mediante un ensayo utilizando Smad2 endógena, estudiamos si Sirt1 se une preferentemente a Smad2 no fosforilada pero sí acetilada. Para ello, utilizamos la proteína fosfatasa λ que promueve la desfosforilación de Smad2 pero deja intacta la acetilación de los residuos K19, K20 y K39. Células Hep3B fueron sometidas a condiciones de TSA y reducción de suero (ver apartado III.2.1) y posteriormente fueron estimuladas con 2 ng/ml de TGF β durante 2 horas, para promover la acetilación de Smad2 (55). Se purificó Smad2 del extracto proteico mediante inmunoprecipitación.

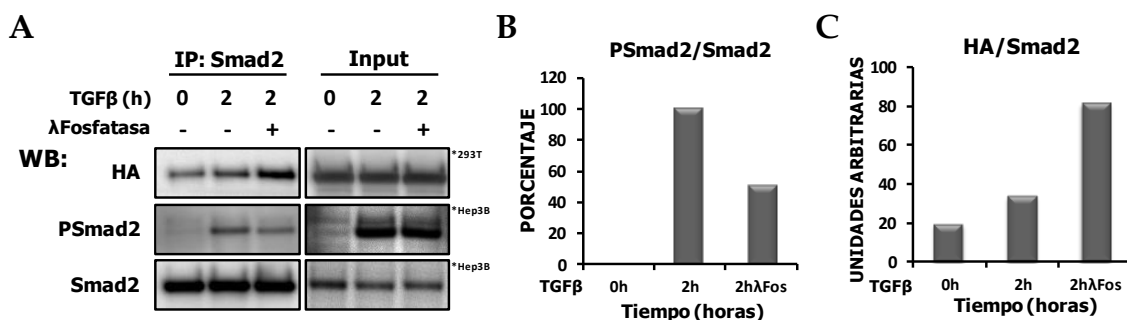


Figura 40. Sirt1 tiene más afinidad por la forma no fosforilada pero acetilada de Smad2. A. Células Hep3B fueron privadas de suero toda la noche y posteriormente tratadas con 2,5 μ M de TSA 8 horas antes de ser estimuladas con 2 ng/ml de TGF β durante 2 horas. Smad2 fue purificada por inmunoprecipitación. La proteína inmunoprecipitada proveniente de los extractos de células estimuladas con TGF β fue dividida en dos fracciones iguales. Tratamos una de estas fracciones con 400 unidades de proteína fosfatasa λ durante 40 minutos a 30 $^{\circ}$ C y la otra fue dejada intacta. A cada uno de los extractos inmunoprecipitados se añadió 300 μ g de extracto proteico total de células HEK293T transfectadas con HA-Sirt1. La mezcla se incubó durante 2 horas a 4 $^{\circ}$ C con agitación constante y finalmente se realizaron 3 lavados con buffer de lisis. HA-Sirt1, Smad2 y Smad2 fosforilada fueron detectadas por Western Blot. B. Cuantificación del porcentaje de Smad2 fosforilada representado respecto a los valores de Smad2. C. Cuantificación de los valores de HA-Sirt1 representados respecto a los valores de Smad2. IP: Inmunoprecipitación, WB: Western Blot. *293T: Input del extracto de células HEK293T añadidas a la resina con Smad2 inmunoprecipitado. *Hep3B: Input de las muestras de células Hep3B usadas para la inmunoprecipitación. λ Fos: muestra tratada con proteína fosfatasa λ .

El total de proteína inmunoprecipitada proveniente de extractos de células estimuladas con TGFβ fue dividida en dos fracciones iguales. Tratamos una de estas fracciones con 400 unidades de proteína fosfatasa λ durante 40 minutos a 30 °C y la otra fue dejada intacta. Finalmente, a cada uno de los extractos inmunoprecipitados se les añadió 300 µg de extracto proteico celular total proveniente de células HEK293T transfectadas con HA-Sirt1. La mezcla fue incubada durante 2 horas con agitación constante y la resina fue lavada varias veces. El contenido de proteína fue analizado por Western Blot. Dicho análisis reveló una disminución del 50% de los niveles de fosforilación de Smad2 en las células tratadas con fosfatasa con respecto al nivel presente en las células sin tratamiento (Figura 40 A, B). En este contexto, detectamos una mayor interacción entre Smad2 y HA-Sirt1 en células estimuladas con TGFβ con respecto a las células sin estimular. Significativamente, la cantidad de HA-Sirt1 capaz de interaccionar con Smad2 se incrementó notablemente cuando Smad2 fue tratado con fosfatasa λ (Figura 40 A, C). Esto datos confirman que Sirt1 tiene más afinidad por la forma no fosforilada pero acetilada de Smad2.

III.5. Estudio del complejo Sirt1/Smad2/Smad4.

III.5.1 ¿Forman un complejo ternario Smad2, Smad4 y Sirt1?

Hemos comprobado que la interacción entre Smad2 y Sirt1 se potencia en presencia de TGFβ (ver apartado III.2.1), sin embargo, Sirt1 parece tener una preferencia de unión a Smad2 no fosforilada (ver apartado III.4.3 y III.4.4). Como la estimulación con TGFβ induce la formación de un complejo compuesto por Smad2 y Smad4, estudiamos si el complejo Smad2/Sirt1 en células estimuladas con TGFβ incluye o no Smad4. Células HEK293T fueron co-transfectadas con Smad2, Smad4 y Sirt1 en diferentes combinaciones fusionadas a distintos epitopos (Figuras 41-43). En todos los casos, tras 24 horas, las células fueron estimuladas con 2 ng/ml de TGFβ durante 1 hora. En un primer experimento, para determinar si Smad2 se une a Smad4 y/o Sirt1, se inmunoprecipitó Flag-Smad2. Los resultados del Western Blot indican que Flag-Smad2 se une tanto a Myc-Smad4 como a HA-Sirt1. La potenciación de la unión

mediada por TGF β es más patente en la interacción entre Myc-Smad4 y Flag-Smad2 que entre HA-Sirt1 y Flag-Smad2 (Figura 41). En una segunda aproximación, para estudiar si Smad4 se une a Smad2 y/o Sirt1, se inmunoprecipitó Flag-Smad4. Los resultados del Western Blot indican que Flag-Smad4 interacciona con HA-Smad2 de manera TGF β dependiente pero no interacciona con Myc-Sirt1 (Figura 42). En un último experimento, para establecer si Sirt1 se une a Smad2 y/o Smad4, se inmunoprecipitó Flag-Sirt1. Los resultados del Western Blot indican que Flag-Sirt1 interacciona con HA-Smad2 pero no con Myc-Smad4 (Figura 43). El análisis de la fosforilación del Smad2 inmunoprecipitado corroboró que Sirt1 se une a Smad2 pero preferentemente a la especie no fosforilada puesto que no se detectó Smad2 fosforilada en la inmunoprecipitación. Smad2, sin embargo, presenta una clara fosforilación tras la estimulación de estas células con TGF β (input) (Figura 43).

Todos estos datos sugieren que, tras la estimulación con TGF β , se producen dos complejos independientes: uno formado por Smad2 y Sirt1, y otro formado por Smad2 y Smad4. En ningún caso se detectó un complejo ternario Smad2/Smad4/Sirt1. Además, estos resultados confirman que Sirt1 interacciona preferentemente con la forma no fosforilada de Smad2.

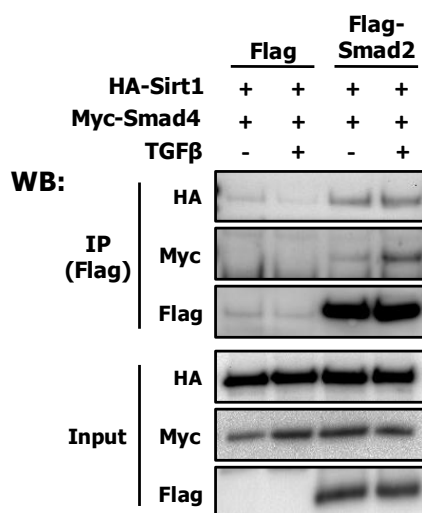


Figura 41. Smad2 interacciona con Smad4 y Sirt1 en respuesta a la estimulación con TGF β . Células HEK293T fueron co-transfectadas con HA-Sirt1 y Myc-Smad4, y Flag-Smad2 o EF-Flag. Las células fueron tratadas con 10 μ M SB-431542 durante toda la noche. Al día siguiente el inhibidor fue lavado y las células fueron estimuladas durante 1 hora con 2 ng/ml de TGF β . Flag-Smad2 fue purificada por inmunoprecipitación. HA-Sirt1, Myc-Smad4 y Flag-Smad2 fueron detectadas por Western Blot. IP. Inmunoprecipitación, WB: Western Blot.

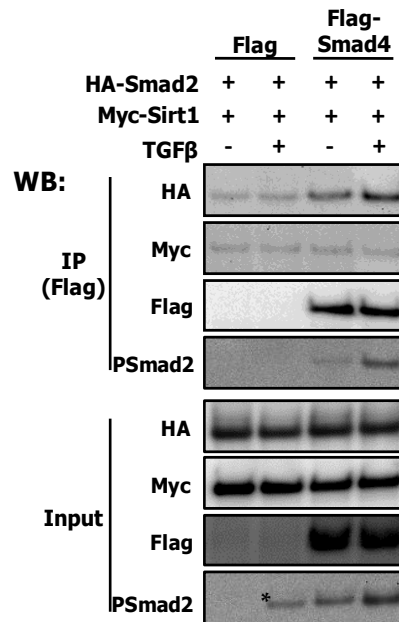


Figura 42. Smad4 interacciona con Smad2 en respuesta a la estimulación con TGFβ, sin embargo, no interacciona con Sirt1. Células HEK293T fueron co-transfectadas con HA-Smad2 y Myc-Sirt1, y Flag-Smad4 o EF-Flag. Las células fueron tratadas con 10 μM SB-431542 durante toda la noche. Al día siguiente el inhibidor fue lavado y las células fueron estimuladas durante 1 hora con 2 ng/ml de TGFβ. Flag-Smad4 fue purificada por inmunoprecipitación. HA-Smad2, Myc-Sirt1, Flag-Smad4 y Smad2 fosforilada fueron detectadas por Western Blot. IP. Inmunoprecipitación, WB: Western Blot. *: Banda de fosforilación de Smad2 endógeno.

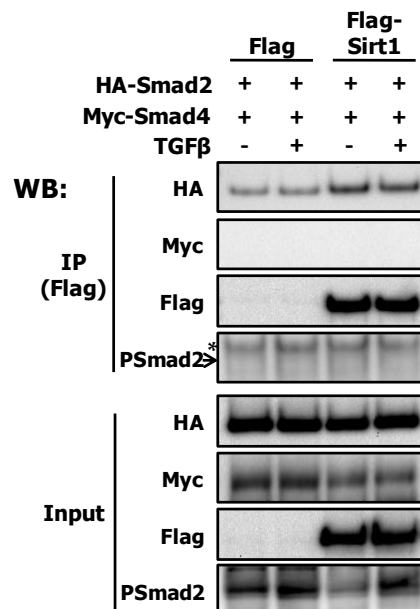


Figura 43. Sirt1 interacciona con Smad2 no fosforilada, pero no con Smad4. Células HEK293T fueron co-transfectadas con HA-Smad2 y Myc-Smad4, y Flag-Sirt1 o EF-Flag. Las células fueron tratadas con 10 μM SB-431542 durante toda la noche. Al día siguiente el inhibidor fue lavado y las células fueron estimuladas durante 1 hora con 2 ng/ml de TGFβ. Flag-Sirt1 fue purificada por inmunoprecipitación. HA-Smad2, Myc-Smad4, Flag-Sirt1 y Smad2 fosforilada fueron detectadas por Western Blot. IP. Inmunoprecipitación, WB: Western Blot. *: Banda inespecífica.

III.5.2 Influencia de la actividad de Sirt1 en la formación del complejo Smad2/Smad4.

Los datos previos mostrados en este trabajo indican que Sirt1 interacciona preferentemente con la forma no fosforilada de Smad2 y, aunque la estimulación con TGF β incrementa la interacción de Smad2 con Sirt1, no se forma un complejo ternario donde esté incluido Smad4 (ver apartado III.5.1). Además, la actividad desacetilasa de Sirt1 es importante en la interacción de Sirt1 con Smad2 (ver apartado III.4.2). Por tanto, cabe la posibilidad de que la interacción de Sirt1 con Smad2 pudiera competir con la formación de un complejo de Smad2 con Smad4 durante la estimulación con TGF β . Quisimos investigar si la activación de Sirt1 por resveratrol, una fitoalexina que activa Sirt1 (194-196), es capaz de competir con Smad4 por su unión a Smad2. Células

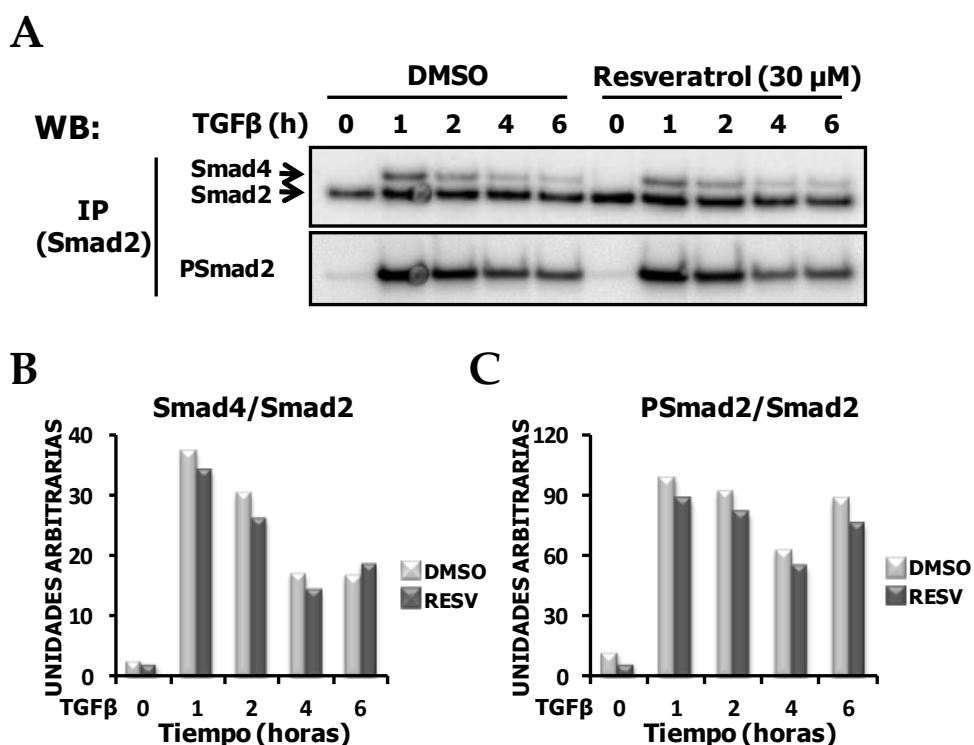


Figura 44. La activación de Sirt1 no compite la formación del complejo Smad2/Smad4 ni causa una terminación prematura de la fosforilación de Smad2 o de la interacción Smad2/Smad4. Células HaCaT fueron tratadas con 30 μ M de resveratrol durante 30 minutos. Posteriormente, las células fueron estimuladas con 2 ng/ml de TGF β a distintos tiempos. Smad2 fue purificada por inmunoprecipitación. Smad2, Smad4 y Smad2 fosforilada fueron detectadas por Western Blot. B. Cuantificación de los valores Smad4 representados respecto a los valores de Smad2. C. Cuantificación de los valores Smad2 fosforilada representados respecto a los valores de Smad2. IP: Inmunoprecipitación, WB: Western Blot. RESV: Resveratrol.

HaCaT fueron tratadas durante 30 minutos con 30 μM resveratrol y posteriormente, fueron estimuladas con 2 ng/ml de TGFβ a distintos tiempos. La inmunoprecipitación con un anticuerpo contra Smad2 y posterior análisis mediante Western Blot reveló que el tratamiento con la mencionada fitoalexina no altera significativamente la cuantía de Smad4 que es inmunoprecipitada con Smad2 ni en el estado de fosforilación de Smad2 (Figura 44 A-C). Por tanto, estos datos sugieren que la activación de Sirt1 por resveratrol no compite la formación del complejo Smad2/Smad4 durante la estimulación con TGFβ, ni causa una terminación prematura de la fosforilación de Smad2 o de la interacción Smad2/Smad4.

III.6. Estudio *in vivo* de la interacción Smad3 y Sirt1.

Al igual que Smad2, Smad3 es fosforilada en su extremo carboxilo terminal tras la estimulación con TGFβ. Esta fosforilación provoca la formación de complejos homoméricos y heteroméricos con Smad4, que se translocan al núcleo donde regulan la transcripción de una gran variedad de genes (5). Smad3 tiene un alto grado de homología de secuencia con Smad2, especialmente en sus dominios MH1 y MH2 (11, 197), pero a diferencia de ésta, Smad3 se une directamente al DNA a través de su dominio MH1 (11). Además, Smad3 también es acetilada por p300/CBP, tras la estimulación con TGFβ (57). Dicha acetilación es más débil que la encontrada en Smad2 (54). La acetilación de Smad3 regula positivamente su actividad transcripcional (57). En el transcurso de nuestra investigación fue descrita la proteína Sirt1 como una desacetilasa para Smad3 (58).

Nos propusimos estudiar si en nuestras manos Sirt1 interacciona con Smad3. Células HEK293T fueron co-transfectadas con HA-Sirt1 y Flag-Smad2 o Flag-Smad3 o EF-Flag y, tras 24 horas, fueron estimuladas con 2 ng/ml de TGFβ durante 1 hora. La inmunoprecipitación del epitopo Flag y posterior análisis mediante Western Blot reveló una interacción entre Flag-Smad3 y HA-Sirt1 que es similar en estado de reposo y durante la estimulación con TGFβ (Figura 45 A, B). En paralelo, probamos la

interacción de Sirt1 con Smad2. La interacción de Flag-Smad3 con HA-Sirt1 es más intensa que la detectada con Flag-Smad2 (Figura 45 A, B).

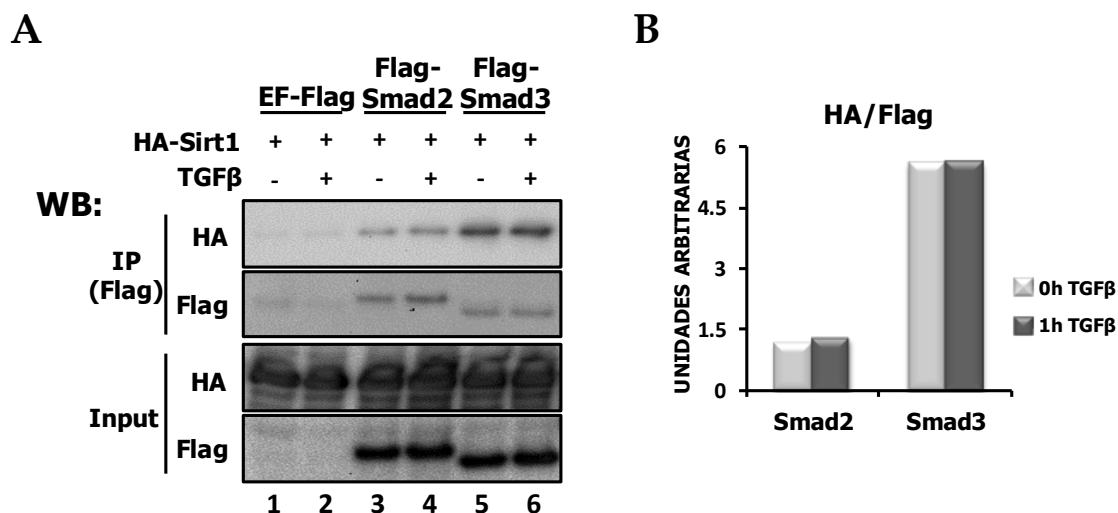


Figura 45. Smad3 y Sirt1 interaccionan *in vivo* en células HEK293T. Células HEK293T fueron co-transfectadas con HA-Sirt1 y Flag-Smad2 o Flag-Smad3 o EF-Flag. Las células fueron tratadas con 10 μ M SB-431542 durante toda la noche. Al día siguiente el inhibidor fue lavado y las células fueron estimuladas durante 1 hora con 2 ng/ml de TGFβ. Flag-Smad2 y Flag-Smad3 fueron aisladas por inmunoprecipitación. HA-Sirt1, Flag-Smad2 y Flag-Smad3 fueron detectadas por Western Blot. B. Cuantificación de los valores de HA-Sirt1 (líneas 3-6) representados respecto a los valores de Flag-Smad2 y Flag-Smad3 (líneas 3-4 y 5-6, respectivamente). IP: Inmunoprecipitación, WB: Western Blot.

III.7. Estudio *in vitro* de la interacción de Sirt1 con Smad2, Smad3, y diferentes fragmentos de Smad2.

Hemos detectado en un sistema celular eucariótico la interacción entre Sirt1 y Smad2 (ver apartado III.2). Smad2 presenta tres dominios claramente definidos: MH1, L y MH2 (198). Mediante un ensayo His-Pulldown, quisimos averiguar si la interacción entre Sirt1 y Smad2 se produce de manera directa. Además, quisimos determinar qué dominio/s de Smad2 están implicados en la interacción con Sirt1. Para ello, Smad2 y diferentes combinaciones de sus dominios fueron clonadas en el vector pGex-4T-1 para producir fusiones traduccionales con GST, que serían posteriormente expresadas en *E. coli* y purificadas (Figura 46 A). Las construcciones obtenidas en pGex-4T-1 (Figura 46 A) fueron introducidas en la estirpe de *E. coli* BL21. La estimulación de

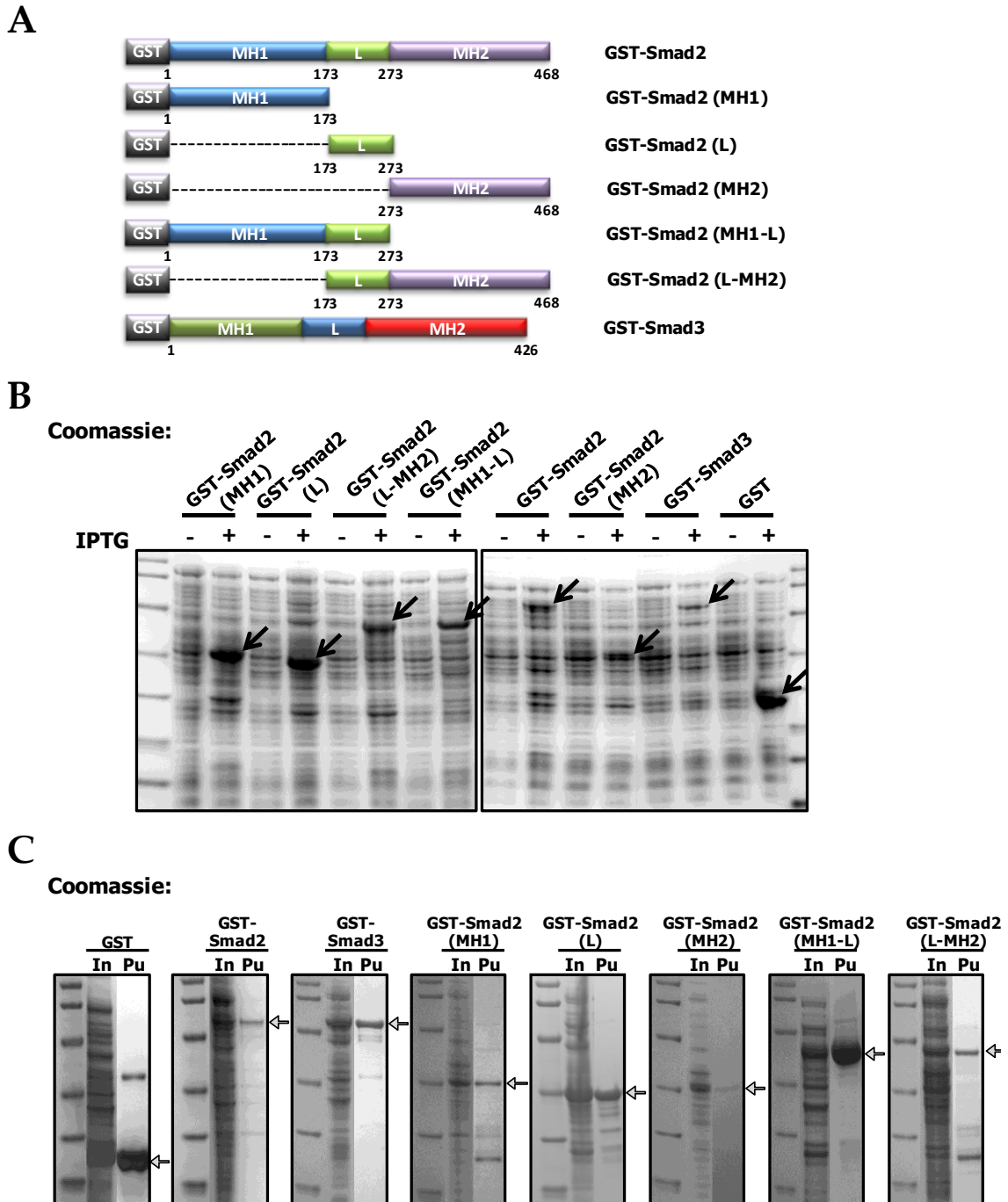


Figura 46. Expresión y purificación de las distintas proteínas clonadas en el vector pGex-4T-1 y expresadas en la cepa de *E. coli* BL21. A. Diagrama de las construcciones realizadas en el vector pGex-4T-1. Se indican los aminoácidos de los que están compuestas cada una de las construcciones. B. Detección por tinción de Coomassie de la expresión de las diferentes proteínas de fusión en la stirpe de *E. coli* BL21 estimulada con 0,5 mM IPTG. Se indica con una flecha la banda correspondiente a cada una de las proteínas de fusión al estimular con IPTG. C. Detección por tinción de Coomassie de las distintas proteínas de fusión purificadas. Se indica con una flecha la banda correspondiente a la proteína de fusión purificada. In: Input, Pu: Purificado.

E. coli con IPTG indujo la expresión de los diferentes fragmentos de Smad2 fusionados a GST (Figura 46 B). Las proteínas de fusión fueron purificadas por afinidad usando glutatión-sepharosa. El posterior lavado extensivo de la resina y la elución con glutatión reducido produjo proteínas purificadas cuyo tamaño era coherente con los fragmentos esperados para cada caso (Figura 46 C).

Para la expresión de Sirt1 como una proteína recombinante de expresión bacteriana, clonamos los cDNAs de Sirt1WT y Sirt1H363Y, respectivamente, en el vector de expresión pQE-70 para producir fusiones traduccionales con una cola de seis histidinas en el extremo carboxilo terminal de la proteína (Figura 47 A). Los plásmidos resultantes, fueron introducidos en la estirpe de *E. coli* M15[pREP4]. La estimulación con IPTG indujo la expresión de ambas proteínas de fusión, Sirt1WT-6xHis y Sirt1H363Y-6xHis (Figura 47 B) que fueron purificadas con una resina conjugada con Ni²⁺ (Figura 47 C). Las proteínas Sirt1WT-6xHis y Sirt1H363Y-6xHis no fueron eluidas sino que se dejaron acopladas a la resina para su posterior uso en el ensayo His-Pulldown.

Una vez purificadas la proteína Sirt1 en sus dos versiones y los diferentes fragmentos de Smad2, se realizó un ensayo de His-Pulldown de combinación de las diferentes proteínas. El análisis mediante Western Blot reveló que tanto Sirt1WT-6xHis como SirtH363Y-6xHis interaccionan de manera directa con GST-Smad2 (Figura 48 A, B). El análisis de la interacción de Sirt1WT-6xHis con los diferentes dominios de Smad2 reveló una interacción con el dominio MH1. También, Sirt1 interacciona con el fragmento L-MH2, sin embargo, no se detecta interacción con el dominio Linker o se detecta muy levemente con el dominio MH2, por separado (Figura 48 A). Todo esto indica que Sirt1 parece interaccionar con Smad2 a través de una zona incluida entre los aminoácidos 173 y 468 (dominios L y MH2) (Figura 48 A). Los datos del análisis de la interacción del mutante Sirt1H363Y-6xHis revelaron una afinidad similar por las mismas regiones de Smad2 que la proteína silvestre (Figura 48 B).

Previamente, hemos detectado la interacción entre Sirt1 y Smad3 *in vivo* (ver apartado III.6), por lo que sometimos a ambas proteínas a un ensayo His-Pulldown para estudiar si la interacción ocurre directamente. Para ello, se clonó la proteína

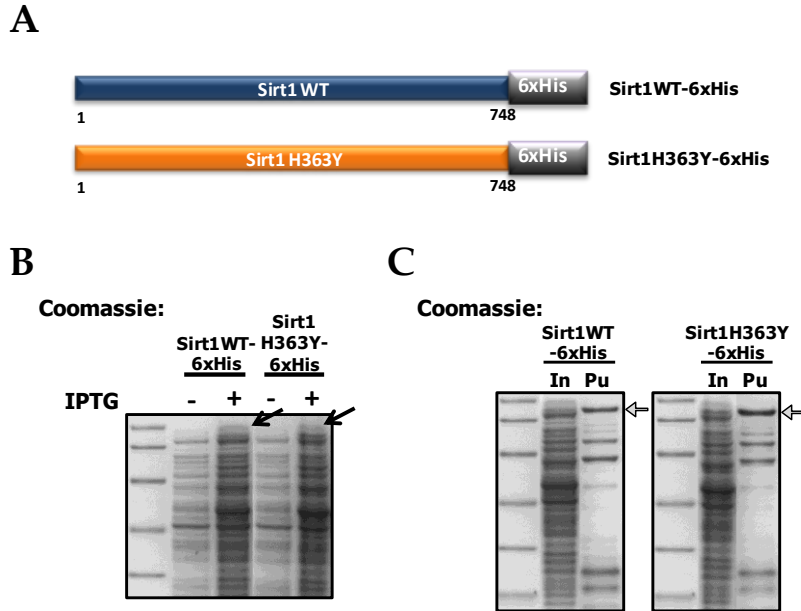


Figura 47. Expresión y purificación de Sirt1WT-6xHis y Sirt1H363Y-6xHis clonadas en el vector pQE-70 y expresadas en la cepa de *E. coli* M15[pREP4]. A. Diagrama de las construcciones realizadas en el vector pQE-70. B. Detección por tinción de Coomassie de la expresión de las dos proteínas de fusión en la estirpe de *E. coli* M15[pREP4] estimulada con 1 mM IPTG. Se indica con una flecha la banda correspondiente de ambas proteínas de fusión al estimular con IPTG. C. Detección por tinción de Coomassie de la purificación de Sirt1WT-6xHis y Sirt1H363Y-6xHis. Se indica con una flecha la banda correspondiente a la proteína de fusión purificada. In: Input, Pu: Purificado.

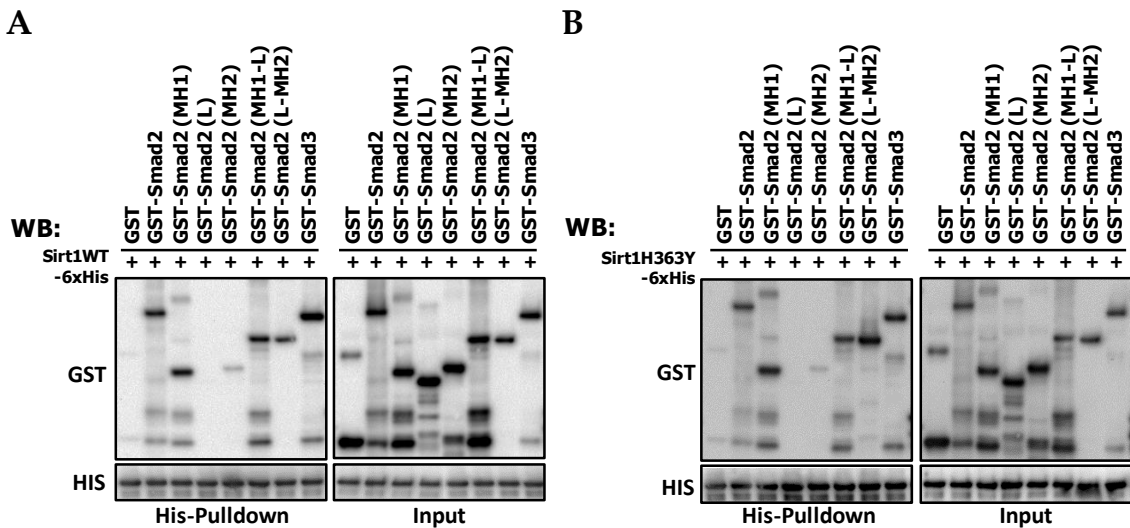


Figura 48. Sirt1 interacta de manera directa con Smad2 y Smad3. La interacción entre Sirt1 y Smad2 se realiza a través del dominio MH1 y una zona incluida entre los dominios L y MH2. A. His-Pull-down de las diferentes proteínas fusionadas a GST con Sirt1WT-6xHis. Las diferentes proteínas fusionadas a GST y Sirt1WT-6xHis fueron detectadas por Western Blot. B. His-Pull-down de las diferentes proteínas fusionadas a GST con Sirt1H363Y-6xHis. Las diferentes proteínas fusionadas a GST y Sirt1H363Y-6xHis fueron detectadas por Western Blot. WB: Western Blot.

Smad3 en el vector pGex-4T-1 para producir la fusión traduccional GST-Smad3 (Figura 46 A). La construcción generada para producir la proteína de fusión fue introducida y expresada en la estirpe de *E. coli* BL21 (Figura 46 B) y purificada por afinidad con glutatión-sepharosa (Figura 46 C). El ensayo His-Pulldown con ambas especies de Sirt1, silvestre y su mutante H363Y, reveló una interacción directa con GST-Smad3, que es más intensa que la detectada para GST-Smad2 (Figura 48 A, B).

Por tanto, estos datos confirman que Smad2 y Smad3 interaccionan directamente con Sirt1 y que, en el caso de Smad2, los dominios involucrados en esta interacción son MH1 y una región incluida entre los dominios L y MH2.

III.8. Estudio *in vitro* de la interacción de Smad2 con diferentes fragmentos de Sirt1.

Sirt1 presenta un dominio catalítico central dependiente de NAD⁺ que está altamente conservado entre los diferentes miembros de la familia de las Sirtuinas. A ambos lados de este dominio central encontramos dos regiones amino y carboxilo terminal no conservadas (78, 81) (Figura 49 A). Sirt1, de 747 aminoácidos, es la Sirtuina más grande en mamíferos (46). Para averiguar qué región/es de Sirt1 están implicadas en la interacción con Smad2, utilizamos un ensayo de His-Pulldown. Para ello, Sirt1 en su longitud total y diferentes fragmentos de esta proteína, fueron clonadas en el vector pQE-70 para producir proteínas con una cola de seis histidinas fusionada en su extremo carboxilo terminal (Figura 49 A). La proteína Sirt1 fue dividida en cuatro fragmentos de igual longitud. Los fragmentos clonados para la expresión de proteínas de fusión fueron la proteína Sirt1 en su longitud total, los fragmentos A, B, C, D y combinaciones de los mismos: AB, BC y CD (Figura 49 A). Los fragmentos B y C solapan con el dominio catalítico de la proteína Sirt1 que se extiende entre los aminoácidos 244 y 498 (100). Las construcciones obtenidas por clonación en pQE-70 fueron introducidos en la estirpe de *E. coli* M15[pREP4]. Las diferentes proteínas expresadas en *E. coli* fueron purificadas con una resina conjugada con Ni²⁺. Todas las

proteínas de fusión se dejaron acopladas a la resina para su posterior uso en el ensayo His-Pulldown.

Para el ensayo de His-Pulldown, se utilizó Flag-Smad2 expresada y posteriormente purificada de células humanas. Células HEK293T fueron transfectadas con Flag-Smad2, tras 24 horas, los extractos proteicos fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo contra Flag. Seguidamente, se realizó la elución de la proteína inmunoprecipitada con un péptido competidor de Flag. La proteína Flag-Smad2 eluida de células HEK293T fue utilizada para la realización de un ensayo His-Pulldown con Sirt1-6xHis y los diferentes fragmentos-6xHis acoplados a resina. Como control negativo de interacción se utilizó una resina sin proteína acoplada. El análisis mediante

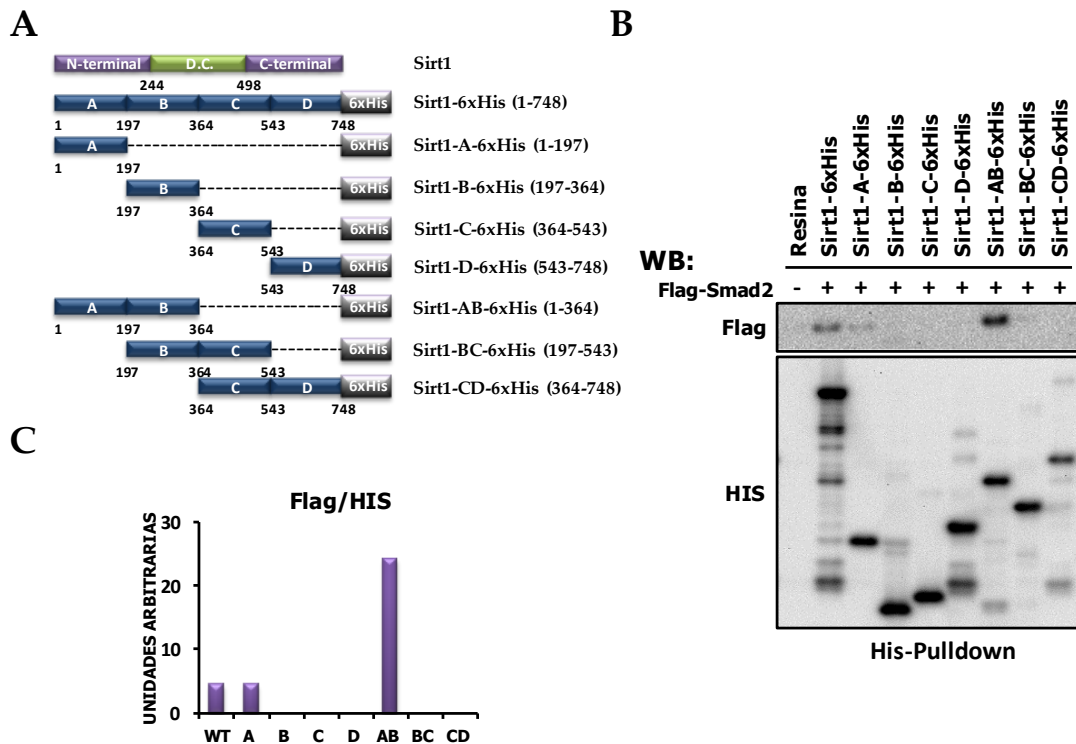


Figura 49. Sirt1 interacciona de manera directa con Smad2. La interacción entre Smad2 y Sirt1 se realiza a través una zona situada entre los aminoácidos 1 y 364 de Sirt1. A. Diagrama de los diferentes fragmentos de Sirt1 clonados en el vector pQE-70. Se indican los aminoácidos de la proteína Sirt1 de los que están compuestos cada uno de las construcciones realizadas en el vector pQE-70. D.C.: Dominio catalítico. B. His-Pulldown de Flag-Smad2 con los diferentes fragmentos de Sirt1 fusionados a 6xHis. Para la obtención de Flag-Smad2 purificada de células eucarióticas, células HEK293T fueron transfectadas con Flag-Smad2. Flag-Smad2 fue inmunoprecipitada y posteriormente eluida con un péptido competidor Flag. Como control negativo del His-Pulldown se utilizó una resina sin proteína acoplada. Sirt1WT-6xHis, los diferentes fragmentos de Sirt1 fusionados a 6xHis y Flag-Smad2 fueron detectados por Western Blot. C. Cuantificación de los valores de Flag-Smad2, representados respecto a los valores de las diferentes proteínas-6xHis purificadas. WB: Western Blot.

Western Blot reveló que Flag-Smad2 interacciona con Sirt1-6xHis directamente (Figura 49 B, C), confirmando los datos obtenidos en el ensayo con GST-Smad2. Además, el experimento revela que Flag-Smad2 se une principalmente al fragmento de Sirt1 AB, y de manera más leve al fragmento A, mientras que no se detecta interacción con el resto de fragmentos de Sirt1 (Figura 49 B, C). No detectamos interacción de Flag-Smad2 con la resina sin proteína acoplada, lo que indica la especificidad de la interacción entre Flag-Smad2 y Sirt1-6xHis y sus diferentes fragmentos (Figura 49 B, C). Por lo tanto, estos datos indican que la interacción de Flag-Smad2 y Sirt1 es directa y que se realiza a través de una zona incluida entre los aminoácidos 1 y 364 de Sirt1 (fragmentos A y B).

III.9. Estudio *in vitro* de la interacción Sirt1 y Smad2 fosforilada.

En experimentos *in vivo*, hemos mostrado que Sirt1 parece tener sólo afinidad por la forma no fosforilada de Smad2 (ver apartado III.4.3, III.4.4 y III.5.1). Quisimos

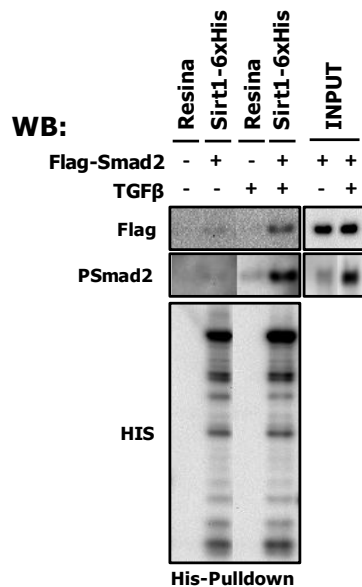


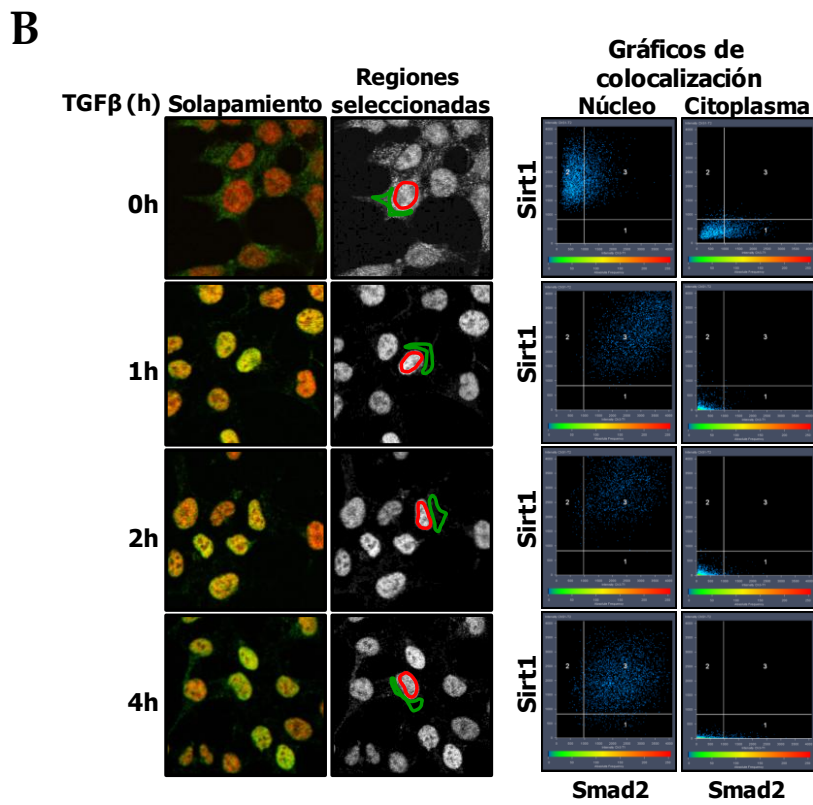
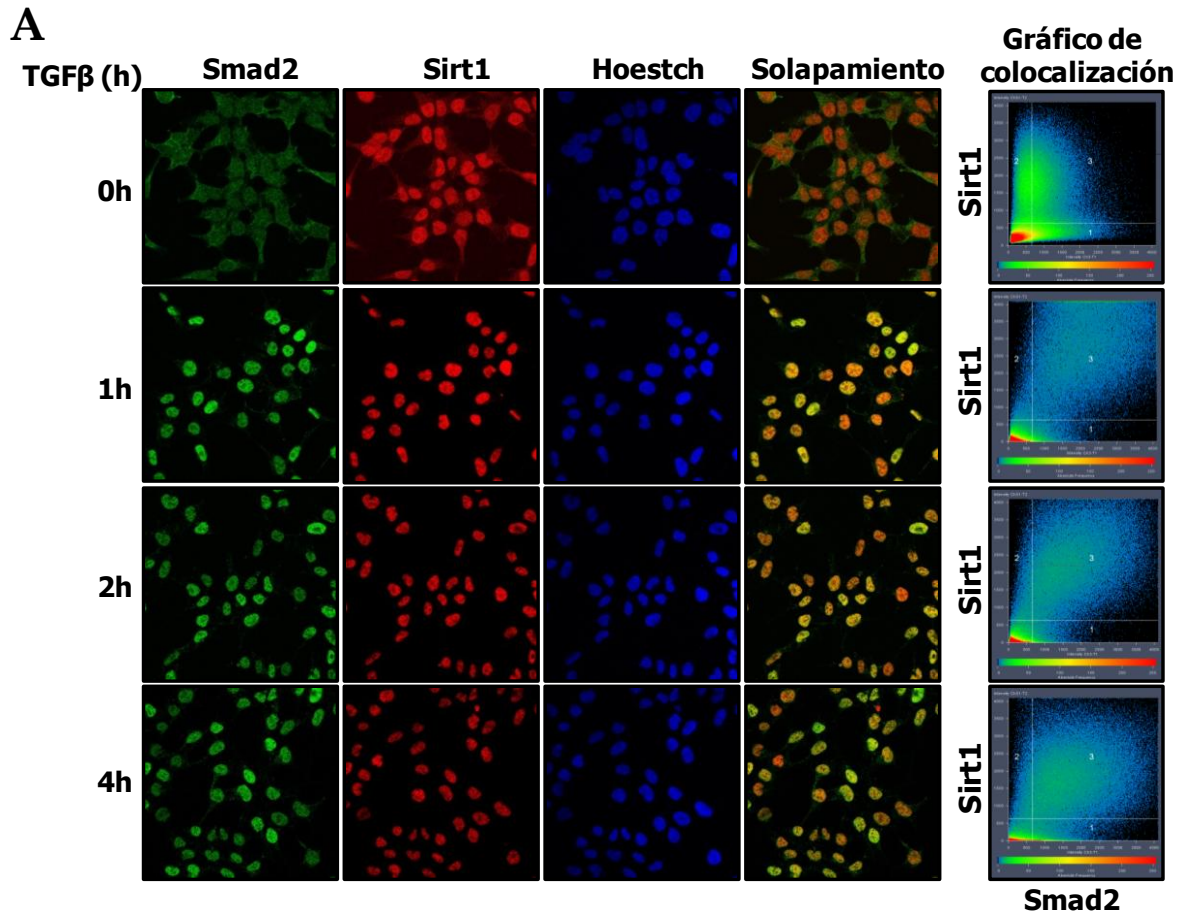
Figura 50. Sirt1 interacciona de manera directa con la forma fosforilada de Smad2. His-Pulldown de Flag-Smad2 con Sirt1-6xHis. Para la obtención de Flag-Smad2 purificada de células eucarióticas, células HEK293T fueron transfectadas con Flag-Smad2. Tras la transfección las células fueron tratadas con 10 μ M SB-431542 durante toda la noche. Al día siguiente el inhibidor fue lavado y las células fueron estimuladas durante 1 hora con 2 ng/ml de TGFβ. Flag-Smad2 fue inmunoprecipitada y posteriormente eluida con un péptido competidor de Flag. Como control negativo del His-Pulldown se utilizó una resina sin proteína acoplada. Sirt1-6xHis, Flag-Smad2 y Smad2 fosforilada fueron detectadas por Western Blot. WB: Western Blot.

investigar, si Sirt1 se une a la forma fosforilada de Smad2 *in vitro*. Realizamos un experimento de His-Pulldown con la proteína Sirt1-6xHis y Flag-Smad2 eluida de células HEK293T estimuladas o no con 2 ng/ml de TGF β durante 1 hora. El análisis mediante Western Blot reveló que la interacción entre Sirt1-6xHis y Flag-Smad2 se ve potenciada cuando la proteína Smad2 proviene de células estimuladas con TGF β (Figura 50). Los datos de fosforilación de Smad2 confirman que la proteína Flag-Smad2 que interacciona con Sirt1-6xHis está fosforilada (Figura 50). Estos datos indican que Sirt1, *in vitro*, interacciona con la forma fosforilada de Smad2.

III.10. Efecto de TGF β sobre la localización subcelular de Sirt1.

Aunque Smad2 es una proteína que entra y sale continuamente del núcleo, en ausencia de estimulación con TGF β , esta proteína presenta una localización aparentemente citosólica que se torna mayoritariamente nuclear tras el estímulo con TGF β (20, 21). Sirt1, por otro lado, presenta una localización subcelular típicamente nuclear (87), sin embargo, dicha localización puede variar dependiendo del tipo de tejido, durante el desarrollo embrionario y la diferenciación celular (26). La localización subcelular de Sirt1 está regulada por vías de señalización como IGF-PI3K-Akt (26, 199),

Figura 51. En células HEK293T, la estimulación con TGF β induce la colocalización de Sirt1 y Smad2 en el núcleo. A. Células HEK293T fueron tratadas con 10 μ M SB-431542 durante toda la noche. Al día siguiente el inhibidor fue retirado y las células fueron estimuladas a diferentes tiempos con 2 ng/ml de TGF β . Las muestras fueron inmunoteñidas con anticuerpos contra Smad2 (verde) o Sirt1 (rojo). Los núcleos fueron visualizados mediante tinción con Hoechst-33258. Solapamiento indica la superposición de las imágenes de las tinciones de Sirt1 y Smad2. Se muestra un caso representativo. Se representan los gráficos de colocalización de ambas proteínas en todas las células de la imagen. B. Gráficos de colocalización de las imágenes tomadas para el apartado A. Se analizó el citoplasma y el núcleo por separado de diferentes células. Se muestra un caso representativo. Se representan en los gráficos la colocalización de ambas proteínas en una de las células de la imagen. Se detallan además las regiones seleccionadas para el estudio de colocalización, en rojo la región nuclear y en verde la citoplasmática. El eje X representa la intensidad del fluoróforo unido a Smad2 y el eje Y la intensidad del fluoróforo unido a Sirt1. La barra de color representa la frecuencia absoluta de cada punto, desde azul (menor frecuencia) a rojo (a mayor frecuencia). El área 1 contiene los píxeles que presentan una intensidad para la fluorescencia correspondiente a Sirt1 por debajo del umbral mínimo de intensidad seleccionado. El área 2 contiene los píxeles que presentan una intensidad para la fluorescencia correspondiente a Smad2 por debajo del umbral mínimo de intensidad seleccionado. El área 3 contiene los píxeles que presentan intensidades elevadas para ambas proteínas.

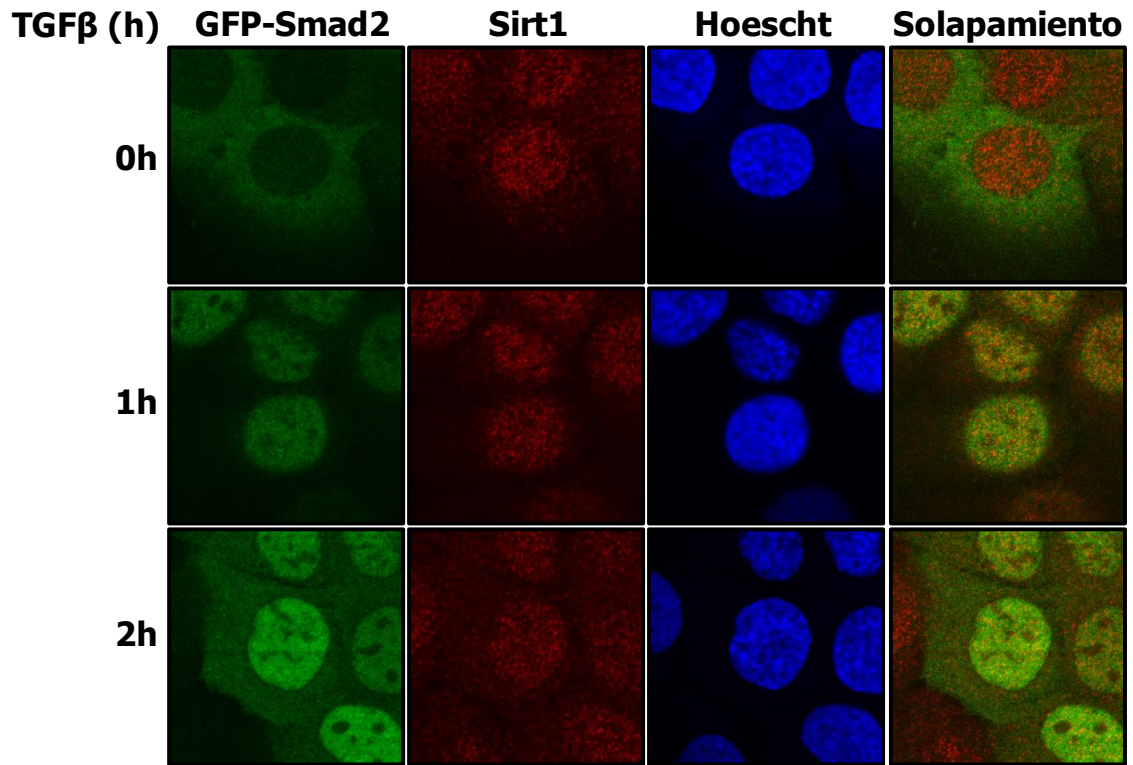


el estrés oxidativo (200), la fosforilación de Sirt1 por JNK1 (112) y estímulos que provocan la diferenciación celular (201), entre otros. Sin embargo, el efecto de TGFβ sobre la localización de Sirt1 no ha sido aún ensayado ni determinado.

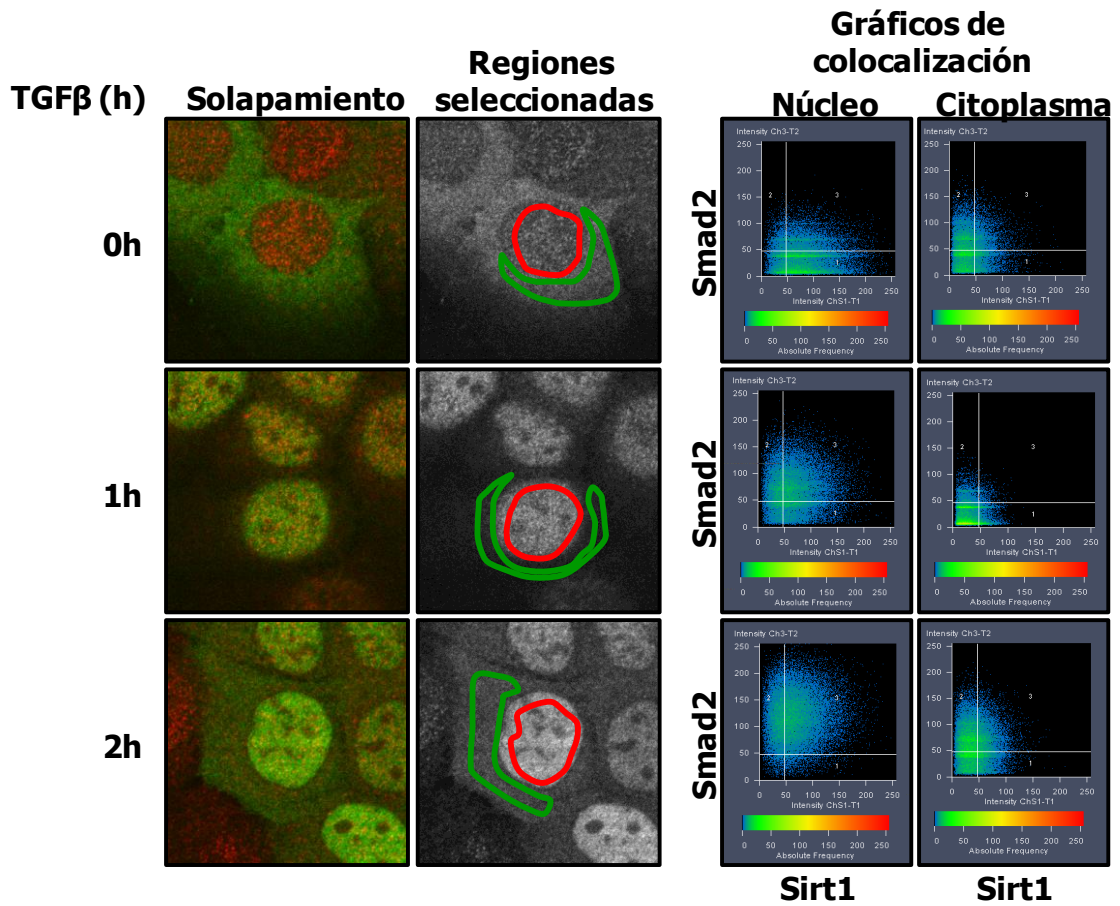
En este trabajo hemos demostrado que Smad2 y Sirt1 interactúan y que dicha interacción es potenciada por la estimulación con TGFβ (ver apartado III.2.1). Para investigar la localización subcelular de ambas proteínas antes y durante la estimulación con TGFβ, células HEK293T fueron estimuladas a distintos tiempos con 2 ng/ml de TGFβ y posteriormente fueron fijadas e inmunoteñidas con anticuerpos contra Sirt1 o Smad2. El examen por microscopía confocal de dichas tinciones reveló que Sirt1 presenta una localización mayoritariamente nuclear. Sin embargo, antes del tratamiento con TGFβ, Sirt1 tiene cierto grado de localización citosólica que deja de observarse tras la estimulación con la citoquina (Figura 51 A). Por otro lado, previamente a la estimulación con TGFβ, Smad2 presenta una distribución citosólica y nuclear que se torna netamente nuclear al estimular las células con dicha citoquina (Figura 51 A). Para determinar si hay una relación en la localización de Smad2 y Sirt1, se realizó el análisis de colocalización de ambas proteínas sobre las imágenes, utilizando el programa informático ZEN de ZEISS. Se analizó la colocalización total en todas las células de la imagen (Figura 51 A) y la colocalización en el citoplasma y núcleo por separado de varias células individuales (Figura 51 B). El estudio de la colocalización se basa en el análisis de la intensidad de los fluoróforos que

Figura 52. En células HaCaT-GFP-Smad2, la estimulación con TGFβ induce la colocalización de Sirt1 y Smad2 en el núcleo. A. Células HaCaT-GFP-Smad2 fueron estimuladas con 2 ng/ml de TGFβ durante 1 y 2 horas. Las muestras fueron fijadas e inmunoteñidas con anticuerpos contra Sirt1 (rojo). Los núcleos fueron visualizados mediante tinción con Hoechst-33258. Solapamiento indica la superposición de las imágenes de la tinción de Sirt1 y GFP-Smad2. Se muestra un caso representativo. B. Gráficos de colocalización de las imágenes tomadas para el apartado A. Se analizó el citoplasma y núcleo por separado de diferentes células. Se representan en los gráficos la colocalización de ambas proteínas en una de las células de la imagen. Se detallan las regiones seleccionadas para el estudio de colocalización, en rojo la región nuclear y en verde la citoplasmática. El eje X representa la intensidad del fluoróforo unido a Sirt1 y el eje Y la intensidad del fluoróforo unido a Smad2. La barra de color representa la frecuencia absoluta de cada punto, desde azul (menor frecuencia) a rojo (a mayor frecuencia). El área 1 contiene los píxeles que presentan una intensidad para la fluorescencia correspondiente a Smad2 por debajo del umbral mínimo de intensidad seleccionado. El área 2 contiene los píxeles que presentan una intensidad para la fluorescencia correspondiente a Sirt1 por debajo del umbral mínimo de intensidad seleccionado. El área 3 contiene los píxeles que presentan intensidades elevadas para ambas proteínas.

A



B



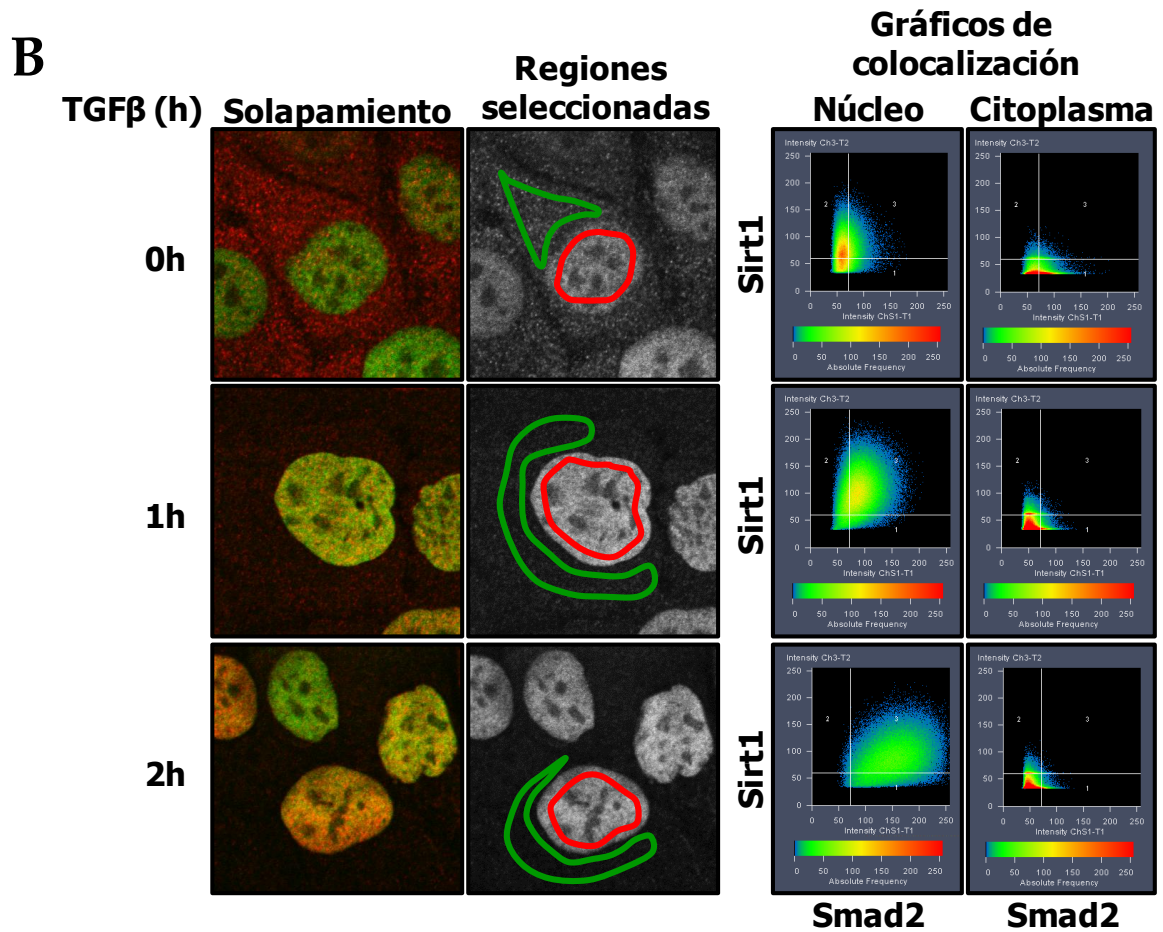
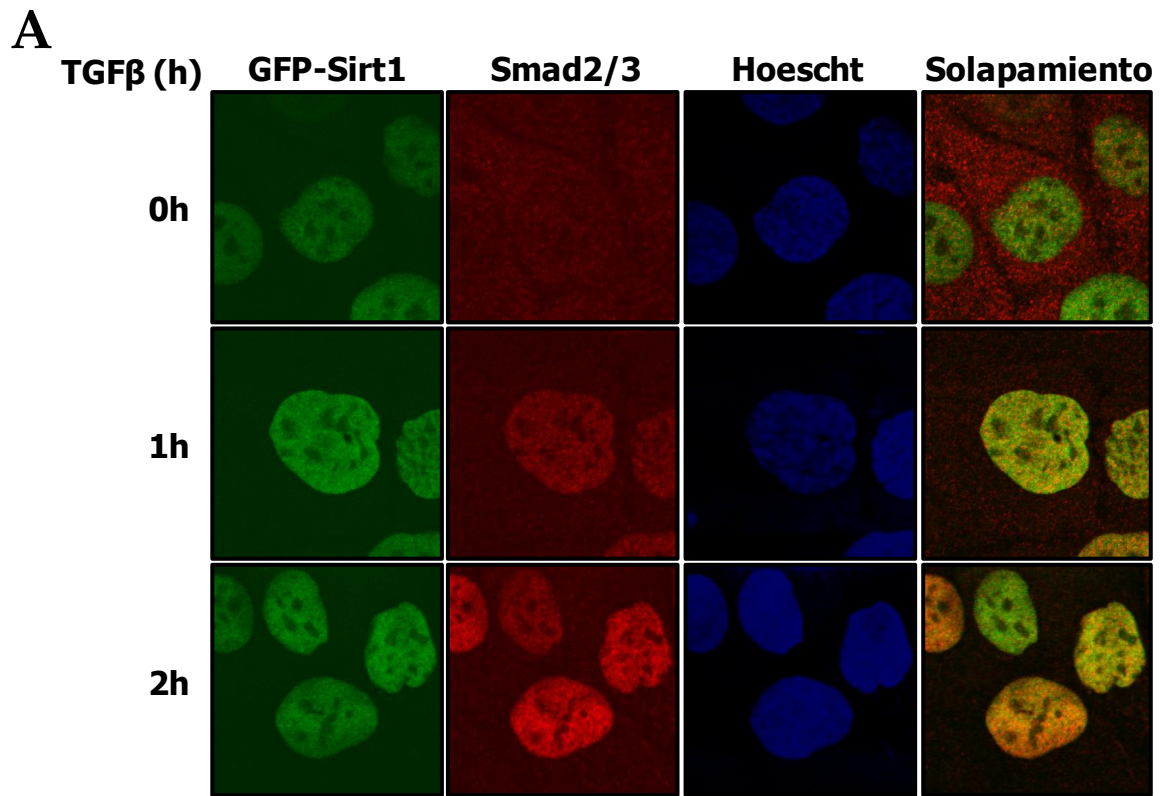
corresponden a Smad2 y Sirt1 de cada píxel de la imagen. Los gráficos de colocalización muestran que el tratamiento con TGFβ aumenta el número de píxeles con intensidades de fluorescencia elevadas para ambas proteínas, manteniéndose tras 4 horas de tratamiento (Figura 51 A). Estos datos indican que el tratamiento de las células HEK293T con TGFβ induce la colocalización de Sirt1 con Smad2 a diferentes tiempos tras la estimulación con TGFβ. El estudio de células individuales muestra que en ausencia de tratamiento con TGFβ, la mayoría de píxeles con elevada fluorescencia para Sirt1 se encuentran situados en el núcleo mientras que los píxeles con elevada fluorescencia para Smad2 se encuentran repartidos entre el núcleo y el citoplasma. El tratamiento con TGFβ incrementa la localización de píxeles con elevada fluorescencia para ambas proteínas en el núcleo (Figura 51 B). Con el tratamiento de TGFβ, los niveles detectados de ambas proteínas en el citoplasma son muy bajos, indicando que Sirt1 y Smad2 no están presentes en el citoplasma tras la estimulación con TGFβ (Figura 51 B). Estos datos indican que Smad2 y Sirt1 colocalizan en el núcleo con el tratamiento de TGFβ a diferentes tiempos.

El coeficiente de colocalización es el número relativo de píxeles que colocalizan en un canal dado (Smad2 o Sirt1) comparado con el total de número de píxeles por encima del umbral. Para este coeficiente, el valor 0 indica no colocalización y el valor 1

TRATAMIENTO TGFβ	Nº DE PIXELS	COEFICIENTE DE COLOCALIZACIÓN DE SMAD2	COEFICIENTE DE COLOCALIZACIÓN DE SIRT1
0horas	63570	0,522	0,372
1horas	91618	0,894	0,902
2horas	98883	0,907	0,827
4horas	107635	0,802	0,830

Tabla 34. Valores de los coeficientes de colocalización de Smad2 y Sirt1 con el tratamiento con TGFβ en células HEK293T. Se analiza el área 3 de los gráficos de colocalización de la figura 51 A. Se indica el tratamiento con TGFβ, el número de píxeles de la región analizada y los valores de los coeficientes de colocalización para ambas proteínas.

Figura 53. En células HaCaT, la estimulación con TGFβ induce la colocalización de Sirt1 y Smad2 en el núcleo. A. Células HaCaT fueron transfectadas con GFP-Sirt1. Tras 24 horas, fueron estimuladas con 2 ng/ml de TGFβ durante 1 y 2 horas. Las muestras fueron fijadas e inmunoteñidas con anticuerpos contra Smad2 (rojo). Los núcleos fueron visualizados mediante tinción con Hoechst-33258. Se muestra un caso representativo. B. Gráficos de colocalización de las imágenes tomadas para el apartado A. Se analizó el citoplasma y núcleo por separado de diferentes células. Para detalles de la figura, ver pie de figura 51.



indica colocalización. En el análisis de colocalización de las imágenes de la figura 51 A, al estimular las células con TGF β , el coeficiente de colocalización aumenta hasta valores cercanos a 1, tanto para Smad2 como para Sirt1, lo que indica un elevado índice de colocalización de estas dos proteínas con el tratamiento con TGF β (Tabla 34). Este dato sugiere que ambas proteínas no sólo se localizan en el núcleo sino que ocupan posiciones muy cercanas en respuesta a TGF β .

Analizamos la localización subcelular de Smad2 y Sirt1 en células HaCaT. Células HaCaT-GFP-Smad2, que expresan GFP-Smad2 de manera estable (20), fueron estimuladas durante 1 y 2 horas con 2 ng/ml de TGF β y posteriormente fueron fijadas e inmunoteñidas con anticuerpos contra Sirt1. El examen por microscopía confocal de dichas tinciones reveló que Sirt1 está localizada principalmente en el núcleo. Antes de la estimulación con TGF β se puede apreciar cierta localización de Sirt1 en el citoplasma que deja de ser patente a la hora de la estimulación con TGF β (Figura 52 A). Además, Smad2 presenta una distribución mayoritariamente citosólica que se vuelve nuclear al estimular las células con TGF β (Figura 52 A). Se analizó la colocalización de ambas proteínas en el citoplasma y núcleo por separado en varias células individuales (Figura 52 B). Este análisis muestra que en células no estimuladas, los píxeles con elevada fluorescencia para Sirt1 se encuentran principalmente en el núcleo y los que tienen elevada fluorescencia para GFP-Smad2 se encuentran en su mayoría en el citosol. Tras la estimulación con TGF β , en el núcleo se encuentran los píxeles con elevada fluorescencia para ambas proteínas (Figura 52 B). A las dos horas de estimulación con TGF β , se observa un incremento en el citosol de GFP-Smad2 y también de Sirt1, aunque mucho más leve (Figura 52 A). Sin embargo, el grado de colocalización de ambas proteínas en el núcleo sigue siendo elevado (Figura 52 B). Estos datos indican que, en células HaCaT, Smad2 y Sirt1 colocalizan en el núcleo tras la estimulación con TGF β .

Realizamos el mismo estudio en células HaCaT donde se transfectó GFP-Sirt1 transitoriamente. Tras 24 horas, las células fueron estimuladas durante 1 y 2 horas con 2 ng/ml de TGF β y posteriormente fueron fijadas e inmunoteñidas con anticuerpos contra Smad2/3. El análisis de colocalización de células individuales muestra que en

ausencia de estimulación con TGF β , la fluorescencia de GFP-Sirt1 se sitúa en el núcleo y la de Smad2 está repartida entre el núcleo y el citoplasma (Figura 53 A, B). Tras la estimulación de las células con TGF β , los píxeles que presentan altos niveles de fluorescencia para Smad2 y Sirt1 se encuentran mayoritariamente en el núcleo, indicando una colocalización de estas dos proteínas en células HaCaT con el tratamiento con TGF β (Figura 53 A, B).

Por tanto, podemos concluir que Smad2 y Sirt1 colocalizan en el núcleo con el tratamiento de TGF β en células HEK293T y HaCaT.

III.11. Efecto de Sirt1 sobre la unión al DNA y activación transcripcional de Smad2 inducidas por TGF β .

III.11.1 Estudio de la formación de complejos Smad/Sirt1/DNA mediante el ensayo de DNA-Pulldown.

Previamente hemos determinado que Sirt1 se une a Smad2 y Smad3 tanto *in vitro* como *in vivo* (ver apartados III.2, III.6 y III.7). Aunque, Sirt1 tiene más afinidad por Smad2 cuando las células son estimuladas con TGF β (ver apartado III.2), no forma un complejo ternario con Smad2 y Smad4 (ver apartado III.5.1). Además, hemos determinado *in vitro* que Sirt1 si se une a Smad2 fosforilada (ver apartado III.8) y determinamos que Sirt1 colocaliza con Smad2 en el núcleo en respuesta a la estimulación con TGF β (ver apartado III.10). La formación de complejos proteicos unidos al DNA sugiere un significado funcional, en el proceso de la transcripción, de dichos complejos (53). Por ello, quisimos estudiar si, en el entorno del DNA, Sirt1 forma un complejo con las Smads en promotores de genes específicos.

Smad2 se une al DNA a través de factores de transcripción, Smad3 sin embargo, al carecer del exón 3 presente en Smad2, interacciona directa y específicamente con secuencias específicas del DNA (10). Utilizamos la técnica del DNA-Pulldown (DNAP) para estudiar si los complejos Smad/Sirt1 que habíamos detectado por

inmunoprecipitación se unen al DNA. Primeramente, estudiamos la unión de Sirt1 y Smad3 al DNA puesto que no necesita la presencia de ningún cofactor. Para realizar el DNAP, se utilizó la secuencia de un elemento regulador del promotor del gen *c-jun* que responde a TGFβ, denominado *c-jun* SBR. Smad3 y Smad4 se unen con gran afinidad a dicho elemento regulador para inducir la transcripción del gen *c-jun* (163, 202). Dicho elemento regulador consiste en varias repeticiones de la secuencia específica de unión de las Smads SBE, CAGA (163).

Se estudió la unión de Sirt1 a la secuencia reguladora *c-jun* SBR y su efecto sobre la interacción de Smad3 y Smad4 con el DNA. El DNAP fue llevado a cabo con oligonucleótidos específicos de la secuencia reguladora *c-jun* SBR, a los que denominamos oligonucleótidos silvestre (WT), y con oligonucleótidos mutados para la secuencia *c-jun* SBR de unión de Smad3 y Smad4, a los que denominamos oligonucleótidos mutantes, que sirven de control negativo de interacción de las Smads (Figura 54). Se emplearon extractos nucleares de células HaCaT estimuladas o no con

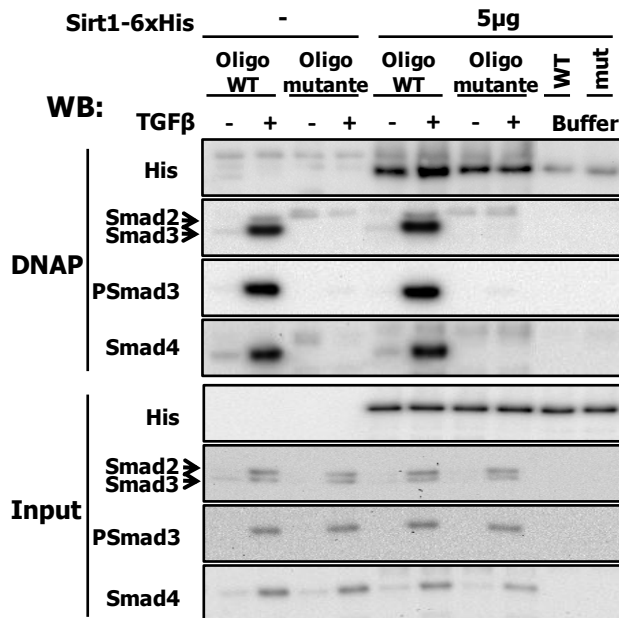


Figura 54. Sirt1 forma un complejo con Smad3 y Smad4 que se une a *c-jun* SBR en extractos de células HaCaT estimuladas con TGFβ. Extractos nucleares de HaCaT estimulados o no con 2 ng/ml de TGFβ durante 1 hora fueron suplementados con 5 µg de Sirt1-6xHis expresada en bacterias. Los extractos fueron sometidos al proceso de DNAP con oligonucleótidos específicos para la secuencia reguladora *c-jun* SBR y oligonucleótidos mutantes para la unión de Smad3 y Smad4. Sirt1-6xHis, Smad3, Smad2, Smad3 fosforilada y Smad4 fueron detectadas por Western Blot. Buffer: DNAP control que se realizó con buffer 140mM NaCl en lugar de extracto nuclear proteico de HaCaT. WB: Western Blot, Oligo WT: oligonucleótido silvestre, Oligo mut: oligonucleótido mutante.

2 ng/ml de TGF β durante 1 hora que fueron suplementados con 5 μ g de Sirt1-6xHis expresada en bacterias (ver apartado III.7). También se realizó un control sin extracto nuclear de HaCaT. El análisis mediante Western Blot, reveló que tanto Smad3 y Smad4 como Sirt1-6xHis se unen específicamente a la secuencia reguladora *c-jun* SBR en extractos de células estimuladas con TGF β (Figura 54). También detectamos, aunque en menor medida, unión de Sirt1-6xHis al DNA en ausencia de estímulo con TGF β . El aumento de la unión de Sirt1-6xHis al DNA en extractos de células estimuladas con TGF β correlaciona con la presencia de Smad3, Smad3 fosforilada y Smad4. Además, la presencia de Sirt1-6xHis no interfiere con la unión de Smad3 y Smad4 a *c-jun* SBR. Smad2, aunque en menor cantidad, también es detectada en estos complejos (Figura 54). Otras secuencias específicas de DNA que unen Smad3/Smad4 como 3X-CAGA, que consta de un trímero del motivo CAGA, están descritas que también unen Smad2 (203, 204). Por otro lado, al realizar el DNAP con el oligonucleótido mutante no se detecta la unión de Smad3 ni Smad4 y en este caso no se observa un aumento en la unión de Sirt1-6xHis al DNA en respuesta a TGF β (Figura 54). En extractos no estimulados con TGF β , Sirt1-6xHis se une con la misma afinidad al oligonucleótido silvestre y al mutante, y la estimulación con TGF β no incrementa la unión de Sirt1-6xHis al oligonucleótido mutante. Estos datos indican que Sirt1 tiene cierta afinidad por el DNA independientemente de la secuencia SBE (Figura 54). Aunque Sirt1-6xHis se detecta unido al DNA de la sonda de *c-jun* SBR en el control sin extracto nuclear de HaCaT, la unión es mucho menor a la unión basal de Sirt1-6xHis a *c-jun* SBR en presencia de proteínas nucleares, lo que sugiere que Sirt1-6xHis necesita de proteínas adicionales presentes en el extracto nuclear para su unión al DNA (Figura 54). Todos estos datos indican que Sirt1 se une al DNA en ausencia de los complejos específicos de las proteínas Smads, pero necesita de proteínas accesorias para dicha unión. Notablemente, Sirt1 incrementa su unión al DNA cuando los complejos Smad se incorporan a secuencias específicas del DNA.

La capacidad de unión de Sirt1-6xHis al DNA en ausencia de Smad3 y Smad4, nos llevó a plantear que Sirt1 pudiera tener cierta capacidad de unión al DNA independientemente de la unión a proteínas específicas que son estimuladas por TGF β . Decidimos estudiar si la unión de Sirt1 al DNA se produce antes o durante la

formación del complejo Smad3/Smad4/DNA, o si es reclutado al DNA una vez que el complejo Smad3/Smad4 ha contactado con éste. Comparamos la capacidad de unión de Sirt1-6xHis a la secuencia *c-jun* SBR antes/durante la formación del complejo Smad3/Smad4 con el DNA (AD) o una vez formado éste (DD). Para ello, realizamos el ensayo de DNAP de dos maneras diferentes: uno donde el DNAP se realiza en extractos proteicos donde Sirt1-6xHis se ha añadido previamente (AD) y otro donde una vez realizado el DNAP de los extractos nucleares, Sirt1-6xHis es añadido a la mezcla de DNA/complejo proteico y el DNA es precipitado de nuevo (DD). Se compararon y analizaron ambos procedimientos mediante Western Blot. En ambos casos, tanto Smad3 como Smad4 se unen con afinidad similar a la secuencia reguladora *c-jun* SBR en extractos de células estimuladas con TGFβ (Figura 55). Sin embargo, la comparación de ambos experimentos reveló una mayor cantidad de Sirt1-6xHis unida al DNA en las muestras donde dicha proteína fue incorporada a los extractos proteicos antes del ensayo DNAP (AD), confirmando el enriquecimiento de Sirt1-6xHis en los

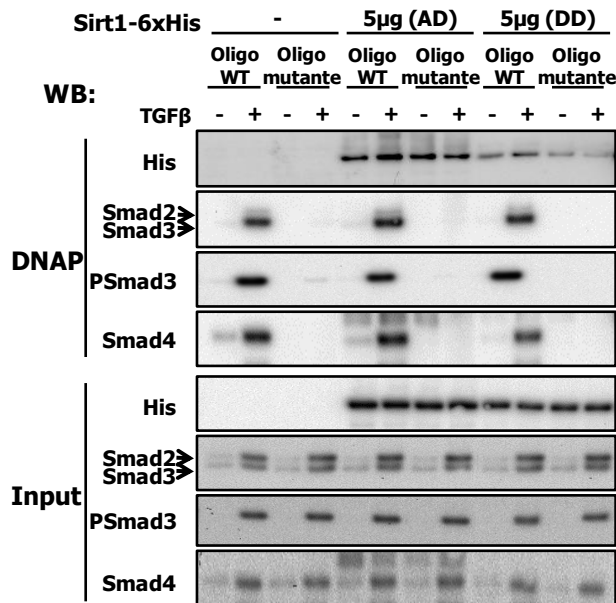


Figura 55. La incorporación de Sirt1 al complejo Smad3/Smad4 se produce antes o durante la formación del complejo Smad3/Smad4/*c-jun* SBR. Extractos nucleares de HaCaT estimulados o no con 2 ng/ml de TGFβ durante 1 hora fueron suplementados con 5 µg de Sirt1-6xHis purificada de bacterias antes de la formación del complejo Smad3/Smad4/*c-jun* SBR (AD) o después (DD). Dichos extractos fueron sometidos al proceso de DNAP con oligonucleótidos específicos para la secuencia reguladora *c-jun* SBR y oligonucleótidos mutantes para la unión de Smad3 y Smad4. Sirt1-6xHis, Smad3, Smad2, Smad3 fosforilada y Smad4 fueron detectadas por Western Blot. WB: Western Blot, Oligo WT: oligonucleótido silvestre, Oligo mut: oligonucleótido mutante.

complejos de unión al DNA procedentes de extractos de células estimuladas con TGF β (Figura 55). Además, se detectó una notable disminución de la unión de Sirt1-6xHis al DNA en todas las muestras donde dicha proteína fue añadida a los complejos previamente unidos al DNA (DD) (Figura 55). Los resultados obtenidos sugieren que Sirt1-6xHis se une a Smad3/Smad4 antes o durante el establecimiento del complejo con *c-jun* SBR para formar un complejo Smad3/Smad4/Sirt1/DNA. Una vez que Smad3/Smad4 se han unido al DNA, Sirt1 se recluta con más dificultad a los complejos ya formados. Además, el hecho de que Sirt1 se una al DNA en ausencia de las Smads, sugiere que Sirt1 pueda estar unida al DNA a través de proteínas accesorias previamente a la unión de las Smads y que la unión de las Smads al DNA incrementa la presencia de Sirt1 en determinadas regiones del DNA.

Hemos visto el complejo formado por Sirt1 con Smad3 y Smad4 en el DNA. Quisimos estudiar si Sirt1 también se une a promotores sensibles a TGF β dependientes de Smad2. Para ello, estudiamos la unión de Sirt1-6xHis a una secuencia de un elemento regulador del promotor del gen *gooseoid* de *Xenopus laevis* que responde a TGF β , denominado DE (66, 68, 155). En células estimuladas con TGF β , el complejo Smad2/Smad4 se une con gran afinidad a dicho elemento regulador para inducir la transcripción del gen *gooseoid*. La unión de Smad2 a DE está mediada por el factor de transcripción Mixer (66).

Estudiamos si Sirt1-6xHis se une a la secuencia reguladora DE junto a Smad2 y Smad4 y qué efecto podría tener sobre la interacción de dichas proteínas con el DNA. Se comparó la unión de Sirt1-6xHis a oligonucleótidos específicos de la secuencia reguladora DE (oligonucleótidos silvestres) con la unión a oligonucleótidos mutados para la secuencia DE de unión de Smad2, Smad4 y Mixer (oligonucleótidos mutantes), que sirven de control negativo de interacción de las Smads. Extractos nucleares procedentes de células HaCaT estimuladas o no con 2 ng/ml de TGF β durante 1 hora fueron suplementados con 30 μ g de extractos nucleares de células HEK293T transfectadas con HA-Mixer y con 5 μ g de Sirt1-6xHis expresada en bacterias (ver apartado III.7). El análisis mediante Western Blot reveló que tanto Smad2, Smad4 como Sirt1-6xHis se unen específicamente a la secuencia reguladora DE en extractos de

células estimuladas con TGFβ (Figura 56). En este complejo también se detectó una presencia importante de Smad3. La presencia de Sirt1-6xHis no interfiere con la unión de Smad2, Smad3, ni Smad4 a DE (Figura 56). Sirt1-6xHis se une al DNA en ausencia de estimulación con TGFβ, aunque muy levemente, y la estimulación con esta citoquina incrementa la unión de Sirt1 al DNA. Este aumento de la unión de Sirt1-6xHis al DNA en extractos de células estimuladas con TGFβ correlaciona con la presencia de Smad2, Smad2 fosforilada, Smad4, Smad3 y HA-Mixer, mientras que al realizar el DNAP con el oligonucleótido mutante, donde no se unen Smad2, Smad3, Smad4 ni HA-Mixer, sólo se detecta un nivel basal de la unión de Sirt1-6xHis al DNA similar al detectado para el oligonucleótido silvestre en ausencia de estimulación con TGFβ (Figura 56). La unión de Sirt1-6xHis al oligonucleótido mutante confirma que Sirt1 se une al DNA también independientemente de la secuencia específica para la unión de Smad2 y Smad4 (Figura 56). Todos estos datos sugieren que Sirt1-6xHis se

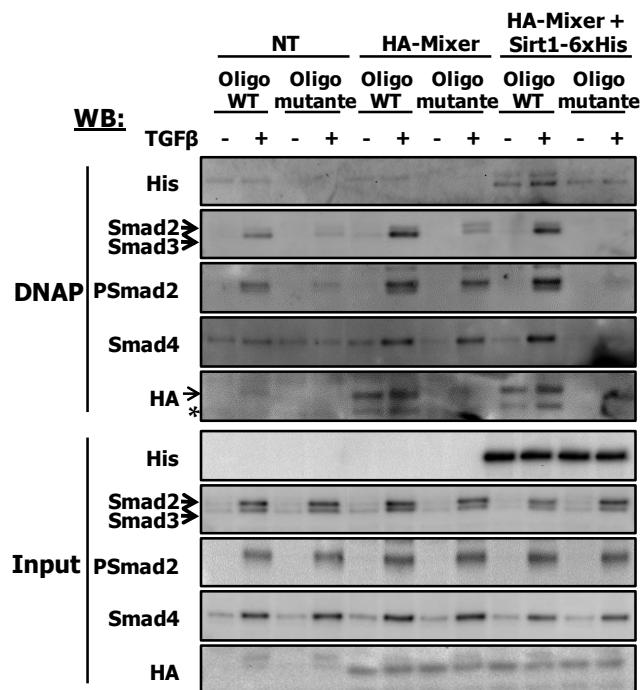


Figura 56. Sirt1 se une al complejo Smad2/Smad3/Smad4/DE en extractos de células estimuladas con TGFβ. Extractos nucleares procedentes de células HaCaT estimuladas o no con 2 ng/ml de TGFβ durante 1 hora fueron suplementadas con 30 µg de extractos nucleares de células HEK293T transfectadas con HA-Mixer y con 5 µg de Sirt1-6xHis expresada en bacterias. Dichos extractos fueron sometidos al proceso de DNAP con oligonucleótidos específicos para la secuencia reguladora DE y oligonucleótidos mutantes para la unión de Smad2 y Smad4. Sirt1-6xHis, Smad2, Smad3, Smad2 fosforilada, Smad4 y Mixer fueron detectadas por Western Blot. WB: Western Blot, Oligo WT: oligonucleótido silvestre, Oligo mut: oligonucleótido mutante.

une levemente al DNA en ausencia de los complejos específicos de las proteínas Smads y que su unión se incrementa cuando los complejos formados por Smad2, Smad3 y Smad4 se incorporan a secuencias específicas del DNA. Además, los datos obtenidos con el DNAP de la secuencia reguladora DE también indican que, en un entorno de DNA, Sirt1 es capaz de unirse a Smad2 fosforilada y Smad4 para unirse a promotores de genes específicos.

III.11.2 Estudio del efecto de la sobreexpresión de Sirt1 sobre genes reporteros sensibles a TGF β .

Las Smads junto con otros factores de transcripción forman complejos proteicos que se unen al DNA cuando las células son estimuladas con TGF β y regulan la actividad transcripcional de un gran número de genes (198). Hemos mostrado que Sirt1 interacciona con Smad2 y Smad3 (ver apartado III.2 y III.6) y forma complejos con ellos en promotores específicos para TGF β (ver apartado III.11.1). Por lo tanto, cabe la posibilidad de que modificaciones en los niveles de expresión de Sirt1 pudieran afectar a la respuesta transcripcional a TGF β . Estudiamos el efecto de la sobreexpresión de Sirt1 sobre la transcripción de algunos promotores dependientes de TGF β . Utilizamos un ensayo de luciferasa para medir el efecto de Sirt1 sobre la actividad transcripcional de dos promotores en respuesta a la estimulación con TGF β . El primero de ellos, DE-Luc (Distal Element), es un gen reportero que consta de la secuencia de un elemento regulador del promotor del gen *gooseoid* de *Xenopus laevis* (21, 66, 68, 155) y el gen de la luciferasa. El complejo Smad2/Smad4 se une a dicho elemento regulador para activar la transcripción del gen *gooseoid*. Para dicha activación, el complejo Smad2/Smad4 necesita un factor de transcripción de *Xenopus* llamado Mixer (66). El segundo gen, ARE-Luc (Activin Responsive Element), es un gen reportero que consta de la secuencia de un elemento regulador del promotor del gen *Mix.2* de *Xenopus laevis* (21, 64-66) y el gen de la luciferasa. El complejo Smad2/Smad4 se une a dicho elemento regulador para activar la transcripción del gen *Mix.2*. Para dicha activación, el complejo Smad2/Smad4 necesita un factor de transcripción de *Xenopus* llamado forkhead box H1 (FoxH1), anteriormente denominado Fast-1 (64).

Estudiamos el efecto de la sobreexpresión de Sirt1 sobre la activación transcripcional del gen reportero DE-Luc. Células Hep3B fueron co-transfectadas con DE-Luc, Flag-Mixer en combinación con Sirt1WT o Sirt1H363Y. Tras 48 horas, las células fueron estimuladas con 2 ng/ml de TGFβ durante 6 horas y posteriormente se analizó la actividad luciferasa. Los resultados muestran una activación del gen reportero DE-Luc con la estimulación de las células con TGFβ que es reprimida parcialmente por la sobreexpresión de Sirt1WT. Dicha sobreexpresión también reprime parcialmente el nivel basal de transcripción de DE-Luc (Figura 57 A). Sin embargo, cuando el ensayo se realizó sobreexpresando Sirt1H363Y, mutante carente de actividad catalítica, no se observó ningún efecto sobre la transcripción dependiente de TGFβ del gen DE-Luc (Figura 57 A). El mismo experimento fue realizado en una línea celular de fibroblastos de ratón que responde a la estimulación con TGFβ, NIH3T3 (202), y que contiene niveles detectables de expresión de Sirt1 (205). La estimulación de las células con TGFβ produce la activación de la transcripción del gen reportero DE-Luc (Figura 57 B). También, en este caso, la sobreexpresión de Sirt1WT reprime parcialmente dicha activación, sin embargo, en esta línea celular, no tiene efecto sobre el nivel basal de transcripción de DE-Luc (Figura 57 B). Además, la sobreexpresión de la versión mutante de Sirt1 incrementa de manera significativa la transcripción de DE-Luc en respuesta a TGFβ (Figura 57 B).

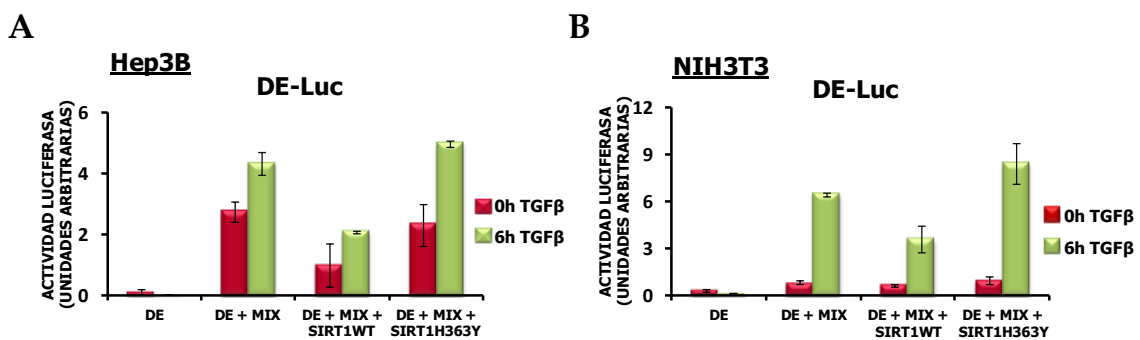


Figura 57. Sirt1 reprime parcialmente la estimulación transcripcional por TGFβ del gen reportero DE-Luc. Dicha inhibición es dependiente de la actividad desacetilasa de Sirt1. Células Hep3B (A) o células NIH3T3 (B) fueron co-transfectadas con DE-Luc, luciferasa Renilla, Flag-Mixer en combinación con Sirt1WT o Sirt1H363Y. Cada transfección se realizó por triplicado. Tras 48 horas, las células fueron estimuladas con 2 ng/ml de TGFβ durante 6 horas. La actividad luciferasa representada es la normalización de la actividad luciferasa firefly con respecto a la actividad de Renilla. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. MIX: Factor de transcripción Mixer.

También estudiamos el efecto de la sobreexpresión de Sirt1 sobre la actividad transcripcional de ARE-Luc (Figura 58). Células NIH3T3 fueron co-transfectadas con ARE-Luc, Flag-FoxH1 en combinación con Sirt1WT o Sirt1H363Y. Tras 48 horas, las células fueron estimuladas con 2 ng/ml de TGF β durante 6 horas y posteriormente se analizó la actividad luciferasa. El análisis del ensayo de luciferasa muestra una activación del gen reportero ARE-Luc con la estimulación de las células con TGF β que es inhibida parcialmente por la sobreexpresión de Sirt1WT (Figura 58). El efecto de la sobreexpresión de Sirt1 sobre la activación del gen reportero ARE-Luc desaparece cuando se emplea el mutante Sirt1H363Y (Figura 58).

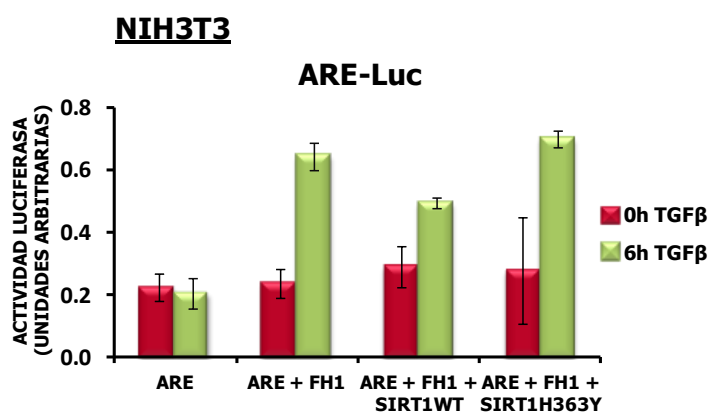


Figura 58. Sirt1 reprime parcialmente la activación transcripcional dependiente de TGF β del gen reportero ARE-Luc. Dicha inhibición es dependiente de la actividad desacetilasa de Sirt1. Células NIH3T3 fueron co-transfectadas con ARE-Luc, luciferasa Renilla, Flag-FoxH1 en combinación con Sirt1WT o Sirt1H363Y. Cada transfección se realizó por triplicado. Tras 48 horas de la transfección, las células fueron estimuladas con 2 ng/ml de TGF β durante 6 horas. La actividad luciferasa representada es la normalización de la actividad luciferasa firefly con respecto a la actividad de Renilla. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. FH1: Factor de transcripción FoxH1.

III.11.3 Estudio del efecto de la represión de Sirt1 sobre genes reporteros sensibles a TGF β .

Estudiamos si la proteína Sirt1 endógena tiene una función reguladora sobre la actividad transcripcional de genes dependientes de TGF β . En este caso, realizamos un estudio de interferencia de la expresión de Sirt1. Se diseñaron dos siRNA específicos para dos secuencias diferentes de Sirt1 que fueron clonados en el plásmido pTER y en el plásmido pTER-GFP, plásmido que expresa el siRNA y GFP simultáneamente. Este

último permite la identificación de las células que han sido transfectadas con el plásmido que expresa la molécula interferente.

Para comprobar la efectividad de ambas secuencias en la interferencia de Sirt1, células Hep3B fueron transfectadas con pTER-GFP-siRNA1 o pTER-GFP-siRNA2. Tras 48 horas, las células fueron fijadas y teñidas con anticuerpos contra Sirt1. Se estudió la expresión de Sirt1 mediante inmunofluorescencia en células transfectadas que eran positivas para la proteína GFP. El análisis mediante microscopía confocal mostró que las células GFP positivas portadoras del vector con el siRNA, expresaban niveles muy bajos de Sirt1 en comparación con células no transfectadas (Figura 59 A). Por lo tanto, ambos siRNAs son efectivos en la interferencia de la expresión de Sirt1. Para cuantificar la efectividad de los siRNAs, células Hep3B fueron transfectadas con el plásmido pTER-GFP o pTER-GFP-siRNA1 o pTER-GFP-siRNA2. Tras 24 horas, las células GFP positivas fueron purificadas mediante el uso de un citómetro de

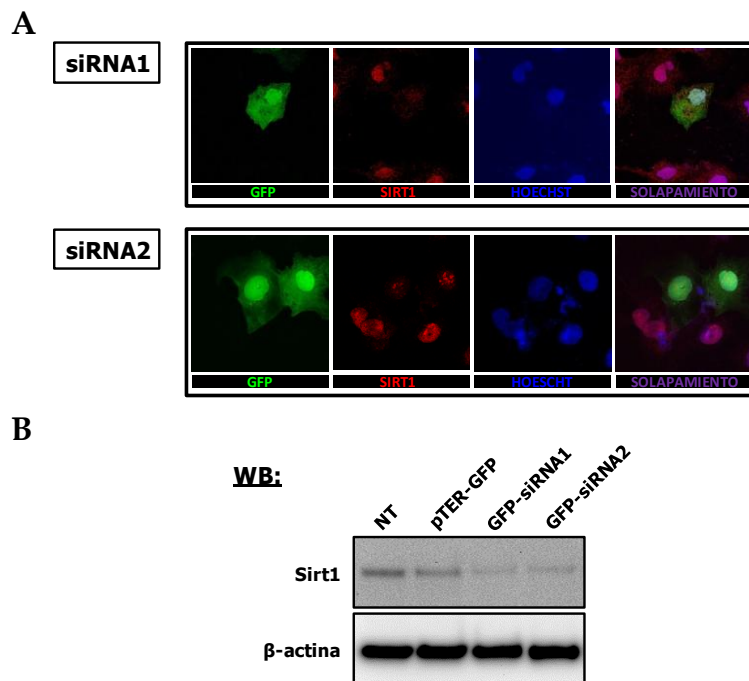


Figura 59. La expresión de siRNA1 y siRNA2 en pTER-GFP es efectiva interfiriendo la expresión de Sirt1. A. Células Hep3B fueron transfectadas con pTER-GFP-siRNA1 o pTER-GFP-siRNA2. Tras 48 horas, las células fueron teñidas con un anticuerpo contra Sirt1. Los núcleos fueron visualizados mediante tinción con Hoechst-33258. Solapamiento indica la unión de las imágenes de GFP, la tinción de Sirt1 y Hoechst. B. Células Hep3B fueron transfectadas con uno de los siguientes plásmidos: pTER-GFP, pTER-GFP-siRNA1 o pTER-GFP-siRNA2. Tras 24 horas, las células positivas para GFP fueron purificadas mediante un citómetro de separación celular de alta velocidad. Sirt1 fue detectada por Western Blot. B-actina fue usada como control de carga. NT: células no transfectadas, WB: Western Blot.

separación celular de alta velocidad MoFlo® (Beckman Coulter), estableciendo una población de en torno al 90% de células GFP positivas, que fue cultivada 24 horas para posteriormente purificar la fracción proteica. El análisis por Western Blot reveló que ambos siRNA son efectivos en la interferencia de la expresión de Sirt1. El siRNA1 y el siRNA2 eliminan un 82% y un 79%, respectivamente, de la cantidad de Sirt1 total presente en células no transfectadas (Figura 59 B).

Determinada la efectividad de los siRNA, estudiamos el efecto de la interferencia de Sirt1 en la activación transcripcional dependiente de TGF β . Células Hep3B fueron co-transfectadas con el gen reportero DE-Luc, Flag-Mixer en combinación con pTER o pTER-siRNA1 o pTER-siRNA2. Tras 48 horas, las células fueron estimuladas con 2 ng/ml de TGF β durante 6 horas y posteriormente se analizó la actividad luciferasa. Los resultados muestran que tanto la expresión del siRNA1 como el siRNA2 aumentan la transcripción dependiente de TGF β del gen reportero DE-Luc respecto a la condición sin siRNA. En ambos casos también se produce un incremento basal de la transcripción de DE-Luc (Figura 60). Estos resultados indican que la disminución de los niveles de expresión de Sirt1 incrementa la transcripción del gen reportero DE-Luc en respuesta a TGF β .

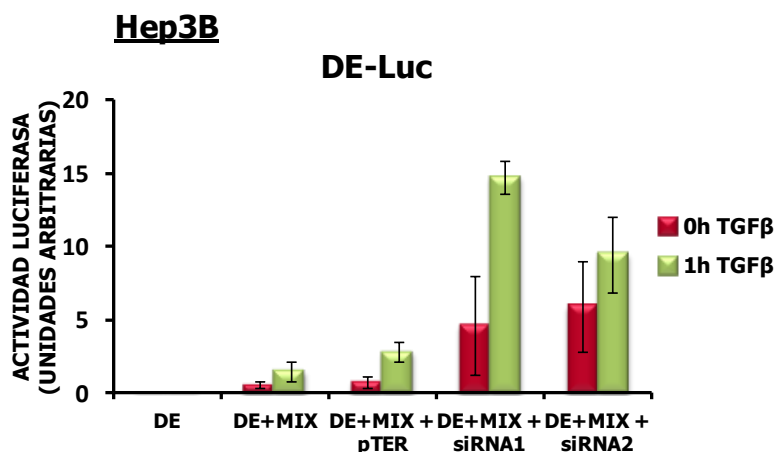


Figura 60. La disminución de los niveles de Sirt1 incrementa la activación transcripcional dependiente de TGF β del gen reportero DE-Luc. Células Hep3B fueron co-transfectadas con DE-Luc, luciferasa Renilla, Flag-Mixer en combinación con pTER o pTER-siRNA1 o pTER -siRNA2. Cada transfección se realizó por triplicado. Tras 48 horas, las células fueron estimuladas con 2 ng/ml de TGF β durante 6 horas. La actividad luciferasa representada es la normalización de la actividad de luciferasa firefly con respecto a la actividad de Renilla. Las barras de error representa la desviación estándar de los datos. MIX: Factor de transcripción Mixer.

Los datos obtenidos del efecto de la sobreexpresión y represión de Sirt1 en la activación transcripcional dependiente de TGF β , sugieren que Sirt1 pudiera tener un papel inhibitorio en la activación transcripcional inducida por de TGF β que depende de su actividad desacetilasa.

III.12. Estudio del efecto de Sirt1 sobre la expresión de genes inducidos por TGF β : RNA-Seq.

III.12.1 Estudio del efecto de la inhibición de Sirt1 en la expresión de genes inducidos por TGF β : RNA-Seq.

La acetilación del núcleo de histonas en el DNA tiene como consecuencia una neutralización parcial de las colas básicas de las histonas, debilitando su interacción con el DNA lo que provoca la relajación de la estructura del nucleosoma y genera una cromatina más abierta y permisiva para la transcripción (46, 72, 102, 206). Sirt1 puede modular la transcripción por remodelación de la cromatina dando lugar a la formación de heterocromatina mediante la desacetilación y metilación de histonas, la metilación del DNA (71, 102, 120) y la desacetilación de acetiltransferasas de histonas como p300 y PCAF (78, 125). Sirt1 también induce el silenciamiento de genes a través de su interacción y desacetilación de factores de transcripción y co-reguladores implicados en la transcripción de determinados genes (58, 78, 120). Nuestros resultados muestran que Sirt1 y Smad2 interaccionan y que dicha interacción es potenciada por TGF β (ver apartado III.2). Además, aunque Sirt1 no parece producir cambios en el estado de acetilación de Smad2 (ver apartado III.3), la interacción entre Smad2 y Sirt1 depende de que Sirt1 tenga intacta su actividad catalítica (ver apartado III.4.2). Sirt1 es reclutada por las Smads a promotores dependientes de TGF β (ver apartado III.11.1) e inhibe la activación transcripcional de genes dependientes de TGF β (ver apartado III.11.2 y III.11.3). Por tanto, Sirt1 al interaccionar con Smad2 podría estar contribuyendo a la desacetilación de histonas, acetiltransferasas de histonas como p300 o factores de transcripción implicados en la respuesta transcripcional a TGF β de promotores donde

las Smads se unen. La respuesta génica a TGF β se concreta en ciertos genes cuya expresión es inducida y otros genes cuya expresión es inhibida en respuesta a TGF β (62). Sirt1 podría ser uno de los elementos utilizados para mediar la regulación negativa de la transcripción de promotores específicos en respuesta a TGF β (Figura 61).

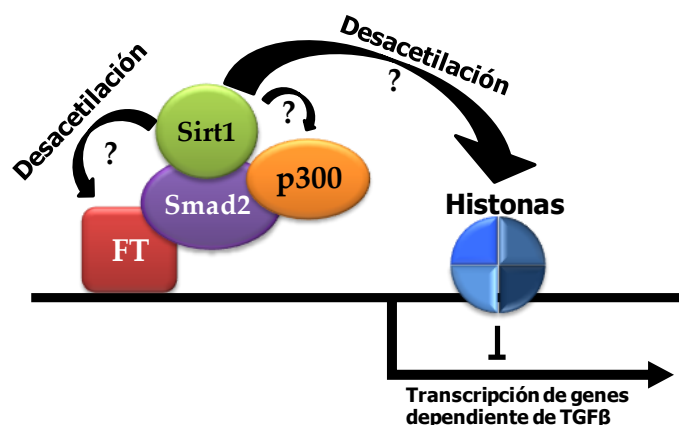


Figura 61. Efecto de Sirt1 sobre la expresión de genes regulada por TGF β . Sirt1 mediaría la regulación negativa de la transcripción de determinados genes, en respuesta a TGF β , a través de la desacetilación de histonas o de acetiltransferasas de histonas como p300 y PCAF, llevando a la formación de heterocromatina. Sirt1 también podría inducir el silenciamiento de dichos genes a través de su interacción y desacetilación de factores de transcripción y co-reguladores.

La actividad de Sirt1 puede ser inhibida por un gran número de moléculas, entre ellas se encuentran dos componentes derivados del indol, EX527 y CHIC-35, y un derivado de la splitomicina, HR73. EX527 es un inhibidor específico y potente de la actividad catalítica de Sirt1 con una IC_{50} de 60-100 nM. EX527 es de 200 a 500 veces más selectivo para Sirt1 que para Sirt2 (IC_{50} 19,6 μ M) o Sirt3 (IC_{50} 48,7 μ M) y no inhibe la actividad de las HDAC tipo I y II a concentraciones de hasta 100 μ M (56, 72). Actualmente, EX527 está en fase 1 de un ensayo clínico para el tratamiento de la enfermedad de Huntington. En estudios preclínicos, EX527 ha mostrado una reducción de la muerte neuronal (207). Por otro lado, CHIC-35 es un potente inhibidor de Sirt1 con una IC_{50} de 60 y 124 nM para el isómero S y mezcla de isómeros, respectivamente. Este inhibidor no inhibe a Sirt3 ni HDACs (208). Por último, HR73 es una α fenil splitomicina con un sustituyente Bromo en posición 8 que inhibe la actividad catalítica de Sirt1 con una IC_{50} menor de 5 μ M. Este compuesto disminuye significativamente la transcripción del VIH interfiriendo con la acetilación de la proteína viral Tat (72, 209).

Los tres inhibidores fueron testados en un experimento piloto con el mismo diseño que el experimento de RNA-Seq que se describe a continuación, pero analizando la expresión por qPCR de varios genes conocidos que sufren una regulación negativa en respuesta a TGFβ (62). Consideramos que al tratar las células con un inhibidor de Sirt1, los genes cuya expresión inhibida por TGFβ requieren de Sirt1 perderían, al menos, parte de la regulación negativa de la expresión. EX527 y HR73 fueron efectivos en su efecto antagónico sobre la regulación negativa de la expresión de determinados genes en respuesta a TGFβ y por tanto fueron seleccionados. CHIC-35, sin embargo, fue descartado por no tener ningún efecto en dicho ensayo (datos no mostrados).

Una vez determinado el efecto de EX527 y HR73 a pequeña escala, decidimos estudiar su efecto sobre la expresión global en respuesta a TGFβ para evaluar la implicación de Sirt1 en la inhibición de la transcripción dependiente de TGFβ. Analizamos la expresión de la totalidad de los genes que se expresan en una célula en respuesta a TGFβ y la comparamos con la expresión en presencia de los inhibidores EX527 o HR73. La línea celular HaCaT, que es capaz de acetilar Smad2 en respuesta a TGFβ (54) y expresa niveles de Sirt1 importantes (ver figura 52), se utilizó para este análisis. El estudio de expresión global se llevó a cabo con una técnica llamada RNA-Sequencing (RNA-Seq), procedimiento que permite conocer íntegramente el transcriptoma de una célula en una situación determinada. Para realizar el RNA-Seq se extrae el mRNA de una célula, se convierte en cDNA y posteriormente se secuencian todas y cada una de las moléculas obtenidas. El análisis de secuenciación permite identificar y determinar el número de moléculas de cDNA para cada uno de los diferentes transcritos expresados en una célula en un instante determinado y por extensión qué genes se están transcribiendo en ese momento.

Células HaCaT fueron tratadas con 1 μM de EX527, 1 μM de HR73 o DMSO (control) durante 2 horas. Seguidamente, las células fueron estimuladas con 2 ng/ml de TGFβ durante 1, 2 y 6 horas. Se extrajo el mRNA de cada una de las muestras y el cDNA resultante fue secuenciado con el secuenciador Illumina Genome Analyzer II. Los resultados de la secuenciación fueron analizados con el programa GENOMATIX

(Genome Analyzer) (210), una herramienta que analiza las lecturas de los fragmentos de cDNA secuenciados y el número de veces que han sido leídos cada uno. Este análisis nos permite establecer el escenario de transcripción general de una célula. Para la localización (“mapeo”) de las lecturas de la secuenciación y la obtención de la cobertura del transcrito y los valores de expresión normalizados, utilizamos una librería de transcriptoma que provee GENOMATIX. Dentro del programa GENOMATIX se utilizó la tarea “RegionMiner” y dentro de ésta la subtarea “Expression Analysis for RNA-Seq Data” (166). Esta última analiza todas las lecturas producidas en la secuenciación del experimento de RNA-Seq y calcula los valores/perfiles de expresión de todos los transcritos disponibles en una base de datos: “El Dorado”. El Dorado es la base de datos de genomas de Genomatix que reúne las referencias de genomas disponibles públicamente de 31 organismos diferentes. Para nuestro análisis seleccionamos la base de datos de humano (*Homo sapiens*). Dicha base contienen la información de transcritos con la estructura de exones/intrones, UTRs, CDS y secuencias de proteínas, promotores para cada transcrito analizado, microRNAs, SNPs, repeticiones genómicas, etc. El análisis del perfil de expresión de todos los transcritos se calcula de forma diferencial con respecto a un control lo que nos permite determinar si varía la expresión de cada uno de los transcritos en respuesta a TGFβ.

El conjunto de lecturas de la secuenciación realizada (input data set) es analizada de tal manera que a cada transcrito se le asigna un valor de expresión normalizado, valor NE (normalize expression value). El valor NE está basado en el número de lecturas localizadas en los exones del transcrito y está normalizado atendiendo a la longitud de dicho transcrito y al número total de lecturas mapeadas de la muestra (Figura 62).

$$NE = \frac{C \times n^{\circ}lecturas_{región}}{n^{\circ}lecturas_{mapeadas} \times longitud_{región}}$$

Figura 62. Fórmula de cálculo para el valor NE. C es una constante de normalización establecida en 10^7 ; $n^{\circ}lecturas_{región}$ son las lecturas (suma de pares de bases) que caen en el transcrito; $n^{\circ}lecturas_{mapeadas}$ son todas las lecturas mapeadas en pares de bases; $longitud_{región}$ es la longitud del transcrito en pares de bases.

El análisis del RNA-Seq generó un conjunto de genes para cada una de las muestras analizadas con un valor NE para 148.464 genes del genoma humano presentes en la base de El Dorado. Se realizó un complejo análisis informático que filtró el conjunto de genes inicial para obtener un conjunto final de genes con respuesta a TGFβ que es modificada por el tratamiento con los inhibidores de Sirt1, EX527 y HR73. Este análisis informático de filtrado consta de los siguientes pasos:

1. Las listas generadas por GENOMATIX contienen el análisis de expresión de las diferentes variantes transcripcionales para cada gen. Con el fin de simplificar el análisis, se seleccionó el transcrito más expresado de cada gen presente en las listas. Éste era el transcrito con mayor valor RPKM (lecturas por kilobase por millón de lecturas mapeadas; término utilizado para medir la abundancia del transcrito). Tras aplicar este filtro se redujo el número de genes a 31.444.

2. El efecto de los inhibidores de Sirt1 debe ser evaluado sobre genes que tengan una expresión suficientemente medible en cualquiera de las muestras control. Se descartaron de todas las listas, los genes cuyo valor NE en todas las muestras pretratadas con DMSO (0, 1, 2 y 6 horas con TGFβ) era menor a 0,015. Por lo tanto, se eliminaron genes que no tenían suficiente expresión en las muestras control. Tras aplicar este filtro se redujo el número de genes a 11.680 genes.

3. El siguiente paso fue seleccionar los genes que varían su expresión en respuesta a TGFβ en más de +0,7 o menos de -0,7 a cualquier tiempo de la estimulación con TGFβ (1, 2 ó 6 horas). Se calculó la variación de la expresión mediante el $\log_2(\text{NE}_{1\text{h } \text{ó } 2\text{h } \text{ó } 6\text{hTGF}\beta} / \text{NE}_{0\text{hTGF}\beta})$. Estimamos que filtrar la lista con el valor de variación de la expresión de +/-0,7 establecía suficiente diferencia para poder apreciar cambios significativos de expresión con posterioridad en el análisis del efecto de los inhibidores de Sirt1 sobre dicha expresión. Tras este filtrado se redujo el número de genes a 2.045.

4. Para cada uno de los genes seleccionados se calculó la variación del valor NE en cada uno de los tiempos de la muestra con inhibidor de Sirt1 respecto a su equivalente de DMSO. Dicho cálculo se hizo aplicando la fórmula siguiente: $\log_2(\text{NE}_{\text{InhibidorTx}} / \text{NE}_{\text{DMSOTx}})$, Ej: $\log_2(\text{NE}_{\text{Inhibidor1hTGF}\beta} / \text{NE}_{\text{DMSO1hTGF}\beta})$. De esta manera se

cuantificó la variación de la expresión de cada muestra con respecto a su control de DMSO. La cuantificación de dicha variación de expresión fue denominada Razón. Los valores de Razón calculados de todos los tiempos de un tratamiento se normalizaron con respecto a la Razón del tiempo 0 del citado tratamiento. Dicha normalización permite comparar con posterioridad los valores de Razón de los dos tratamientos de los inhibidores de Sirt1.

5. A continuación, para eliminar los genes con variaciones de expresión pequeñas entre la muestra del inhibidor de Sirt1 y la muestra control, se realizó un filtrado seleccionando los genes cuyo valor de Razón ($\log_2(\text{NE}_{\text{InhibidorTx}}/\text{NE}_{\text{DMSOTx}})$) normalizada era mayor de +0,7 o menor de -0,7. Este filtrado se aplicó a los tiempos 1 hora y 6 horas con TGF β para posteriormente poder analizar el efecto de los inhibidores de Sirt1 sobre la expresión de los genes en una respuesta temprana a TGF β (1 hora) o más tardía (6 horas) (62). Este filtrado redujo el número de genes a estudiar y seleccionó aquellos con un grado de variación importante. En otras palabras, este procedimiento seleccionó los genes en los que el tratamiento con el inhibidor de Sirt1 tiene un efecto más relevante. Tras el filtrado, el número de genes seleccionados en ambos tiempos (1 y 6 horas con TGF β) se redujo a unos centenares. El número para cada tiempo e inhibidor se detalla en la tabla 35.

$\log_2(\text{NE}_{\text{InhibidorTx}}/\text{NE}_{\text{DMSOTx}}) > +0,7$ y $< -0,7$				
	EX527		HR73	
	1h	6h	1h	6h
Nº de genes	485	555	430	599

Tabla 35. Número de genes seleccionados cuya Razón ($\log_2(\text{NE}_{\text{InhibidorTx}}/\text{NE}_{\text{DMSOTx}})$) normalizada es mayor a +0,7 ó menor a -0,7. Se indica dicho número de genes para el tratamiento con cada uno de los inhibidores de Sirt1, EX527 y HR73, a 1h y 6h de tratamiento con TGF β en las dos condiciones de variación: $\log_2(\text{NE}_{\text{InhibidorTx}}/\text{NE}_{\text{DMSOTx}}) > +0,7$ y $\log_2(\text{NE}_{\text{InhibidorTx}}/\text{NE}_{\text{DMSOTx}}) < -0,7$.

6. En la siguiente etapa, se separaron los genes en dos grupos atendiendo a que su valor de Razón ($\log_2(\text{NE}_{\text{InhibidorTx}}/\text{NE}_{\text{DMSOTx}})$) normalizada fuera mayor a +0,7 ó menor a -0,7 (Tabla 36). La selección de genes con valores de Razón superior a +0,7 indica que el valor NE de la muestra con inhibidor es mayor que el valor NE de la

muestra control, por el contrario, los genes seleccionados con valor de Razón inferior a -0,7 indica que el valor de NE de la muestra con inhibidor es menor que el valor de NE de la muestra control. Para descartar el efecto que el uso de estos inhibidores tuvieran sobre otros sustratos diferentes a Sirt1 y que afectara a la expresión de genes dependientes de TGFβ, comparamos ambas listas de genes obtenidas con los dos inhibidores de Sirt1 y seleccionamos los genes comunes en ellas para un mismo tiempo (Tabla 37) (Figura 63). Para ello, se utilizó el programa Venny (167), una herramienta interactiva que compara listas de elementos e identifica los comunes entre ellas. Así, en la selección de genes con valor de Razón normalizada mayor a +0,7 a 1 hora con TGFβ, de 163 y 154 genes seleccionados para los inhibidores EX527 y HR73, respectivamente (Tabla 36), encontramos 65 genes comunes (Tabla 37). Este procedimiento se aplicó para el resto de tiempos y Razones normalizadas (Tabla 37) (Figura 63).

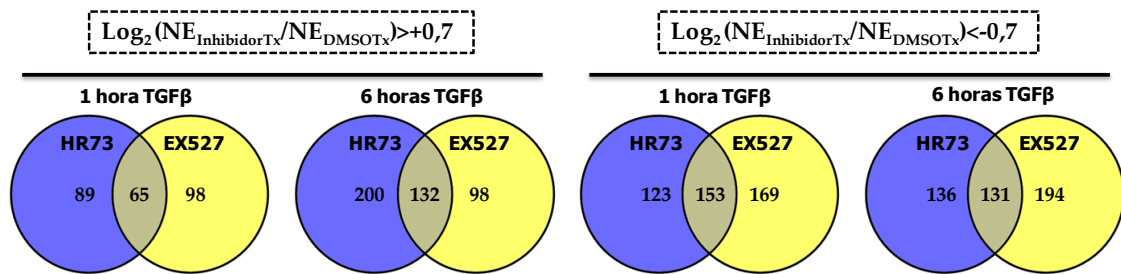


Figura 63. Representación en Diagramas de Venn de los grupos de genes seleccionados con Razón normalizada mayor a +0,7 o menor a -0,7 para cada uno de los tratamientos con los inhibidores EX527 y HR73 (Tabla 36). Se indica el número de genes que son comunes a los tratamientos con los inhibidores de Sirt1, EX527 y HR73, y los que no son comunes en ambos grupos. Se detalla dicha información en cada uno de los grupos mostrados a continuación: $\log_2(NE_{InhibidorTx}/NE_{DMSOTx}) > +0,7$ a 1 hora y a 6 horas con TGFβ y $\log_2(NE_{InhibidorTx}/NE_{DMSOTx}) < -0,7$ a 1 hora y a 6 horas con TGFβ.

Nº de genes	Log ₂ (NE _{InhibidorTx} /NE _{DMSOTx}) > +0,7				Log ₂ (NE _{InhibidorTx} /NE _{DMSOTx}) < -0,7			
	EX527		HR73		EX527		HR73	
	1h	6h	1h	6h	1h	6h	1h	6h
	163	230	154	332	322	325	276	267

Tabla 36. Número de genes seleccionados cuya Razón ($\log_2(NE_{InhibidorTx}/NE_{DMSOTx})$) normalizada es mayor a +0,7 ó menor a -0,7 para cada uno de los tratamientos con los inhibidores EX527 y HR73. Se indica dicho número de genes para el tratamiento con cada uno de los inhibidores de Sirt1, EX527 y HR73, a 1h y 6h de tratamiento con TGFβ en las dos condiciones de variación por separado: $\log_2(NE_{InhibidorTx}/NE_{DMSOTx}) > +0,7$ y $\log_2(NE_{InhibidorTx}/NE_{DMSOTx}) < -0,7$.

Nº de genes	$\text{Log}_2 (\text{NE}_{\text{InhibidorTx}}/\text{NE}_{\text{DMSOTx}}) > +0,7$		$\text{Log}_2 (\text{NE}_{\text{InhibidorTx}}/\text{NE}_{\text{DMSOTx}}) < -0,7$	
	EX527&HR73		EX527&HR73	
	1h	6h	1h	6h
	65	132	153	131

Tabla 37. Número de genes comunes a los tratamientos con los inhibidores EX527 y HR73, cuya Razón ($\text{log}_2(\text{NE}_{\text{InhibidorTx}}/\text{NE}_{\text{DMSOTx}})$) normalizada es mayor a +0,7 ó menor a -0,7. Se indica el número de genes comunes a los tratamientos con los inhibidores de Sirt1, EX527 y HR73, a 1h y 6h de tratamiento con TGF β en las dos condiciones de variación por separado: $\text{log}_2 (\text{NE}_{\text{InhibidorTx}}/\text{NE}_{\text{DMSOTx}}) > +0,7$ y $\text{log}_2 (\text{NE}_{\text{InhibidorTx}}/\text{NE}_{\text{DMSOTx}}) < -0,7$.

Un análisis más detallado de los genes comunes en ambas listas de inhibidores (Tabla 37), reveló que la mayoría de los que se encontraban en el grupo con $\text{log}_2(\text{NE}_{\text{InhibidorTx}}/\text{NE}_{\text{DMSOTx}}) > +0,7$ pertenecen a la categoría de genes cuya expresión es inhibida por TGF β . La inhibición de Sirt1 antagoniza la regulación negativa de la expresión producida por TGF β , llegando en algunos casos incluso a inducir la expresión del gen. Un ejemplo de este grupo es el gen *CCDC34* (Figura 64 A). Por el contrario, la mayoría de los genes que se encontraban en el grupo con $\text{log}_2(\text{NE}_{\text{InhibidorTx}}/\text{NE}_{\text{DMSOTx}}) < -0,7$ pertenecen a la categoría de genes cuya expresión es

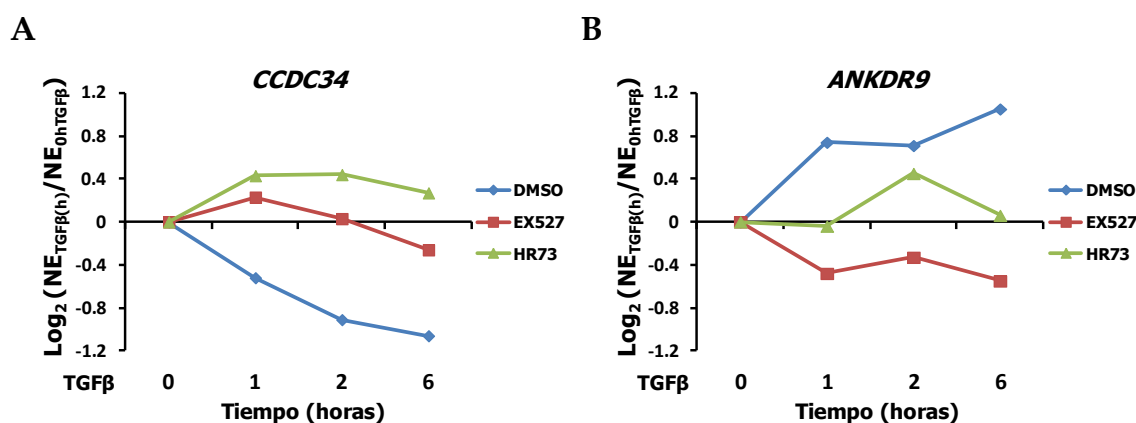


Figura 64. Variación de la expresión de dos genes con el tratamiento con TGF β en ausencia o presencia de los inhibidores de Sirt1, EX527 y HR73. Se representa la variación de la expresión de dos genes distintos a 1, 2 y 6 horas tras el estímulo con TGF β con respecto a 0 horas con TGF β en ausencia o presencia de los inhibidores de Sirt1, EX527 y HR73. La variación de la expresión se representa como el $\text{log}_2(\text{NE}_{1\text{h}} \text{ ó } 2\text{h} \text{ ó } 6\text{hTGF}\beta/\text{NE}_{0\text{hTGF}\beta})$. A. Expresión del gen *CCDC34*, uno de los genes perteneciente al grupo donde el $\text{log}_2(\text{NE}_{\text{InhibidorTx}}/\text{NE}_{\text{DMSOTx}})$ es mayor a +0,7. B. Expresión del gen *ANKRD9*, uno de los genes perteneciente al grupo donde el $\text{log}_2(\text{NE}_{\text{InhibidorTx}}/\text{NE}_{\text{DMSOTx}})$ es menor a -0,7.

estimulada por TGFβ. La inhibición de Sirt1 antagoniza la activación de la expresión, llegando en algunos casos a inhibir la expresión del gen. Un ejemplo de este grupo es el gen *ANKRD9* (Figura 64 B). Por tanto, estos datos sugieren que el uso de inhibidores para Sirt1 tiene consecuencias diferentes dependiendo del efecto regulador de TGFβ, antagonizando la regulación tanto negativa (grupo $\log_2 (NE_{\text{InhibidorTx}}/NE_{\text{DMSOTx}}) > +0,7$) como positiva (grupo $\log_2 (NE_{\text{InhibidorTx}}/NE_{\text{DMSOTx}}) < -0,7$) de TGFβ sobre varios genes. Estos datos apuntan a que Sirt1 estaría implicada en la regulación negativa de la transcripción dependiente de TGFβ de determinados genes o en la activación de la transcripción dependiente de TGFβ para otros genes.

III.12.2 Inmunoprecipitación de cromatina – Secuenciación (ChIP-Seq).

Para poner en valor los datos obtenidos por RNA-Seq, decidimos mapear el genoma humano para sitios que unieran Smad2 en respuesta a la estimulación con TGFβ. Dicho análisis se llevó a cabo con una técnica llamada ChIP-Seq, procedimiento usado para analizar interacciones proteína-DNA que combina la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) con una secuenciación masiva posterior de DNA (Seq) que permite identificar el cistroma de genes al que se une una proteína. Con este método podemos identificar qué secuencias o qué regiones génicas unen nuestra proteína de interés (211, 212). Se realizó un ChIP-Seq para la proteína Smad2 en células HaCaT transfectadas establemente con GFP-Smad2 (HaCaT-GFP-Smad2) (20). En dichas células, GFP-Smad2 es funcional y se comporta como la proteína Smad2 endógena: en respuesta a TGFβ, GFP-Smad2 es fosforilada en su extremo carboxilo terminal, se une a Smad4, es translocada al núcleo, forma complejos transcripcionales junto con Smad4 y FoxH1 unidos al elemento regulador ARE y es transcripcionalmente activa potenciando la activación de la transcripción del gen chivato ARE-Luc por TGFβ (20). Células HaCaT-GFP-Smad2 fueron estimuladas con 2 ng/ml de TGFβ durante 1 y 6 horas. Se extrajo la cromatina, se fraccionó con el sonicador Bioruptor® y se realizó una inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo contra GFP.

Antes de secuenciar masivamente el DNA inmunoprecipitado, validamos la inmunoprecipitación analizando la presencia de GFP-Smad2 en promotores de tres

genes conocidos que unen Smad2: *SERPINE1* (*PAI1*), *JUNB* e *ID1*. Como control negativo se utilizó el promotor del gen *HPRT1* caracterizado por la ausencia de unión de Smad2 (213). Utilizando la técnica de PCR cuantitativa (qPCR) y primers específicos que amplifican la secuencia de unión a Smad2 en cada uno de los promotores, se calculó el porcentaje de DNA inmunoprecipitado de los promotores con respecto a la muestra de cromatina sin inmunoprecipitar: Recuperación. En los tres promotores analizados, la Recuperación reveló un aumento sustancial de DNA inmunoprecipitado en las células estimuladas con TGF β durante 1 hora (Figura 65 A). La cantidad de DNA inmunoprecipitado disminuye a las 6 horas de tratamiento con dicha citoquina aunque sigue siendo superior a la muestra control no tratada con TGF β (Figura 65 A). En claro contraste, se detectó una cantidad residual de GFP-Smad2 unido al promotor de gen *HPRT1* (Figura 65 A). Estos datos indican que GFP-Smad2 se une a los promotores *SERPINE1*, *JUNB* e *ID1* al estimular las células con TGF β y muestra un valor máximo de unión a la hora de tratamiento. Por otro lado, se analizó el grado de ocupación de GFP-Smad2 en los promotores mencionados anteriormente con respecto a la ocupación residual del gen *HPRT1*: Ocupación. La Ocupación determina la especificidad de la unión de GFP-Smad2 a los distintos promotores. La estimulación de las células con TGF β durante 1 hora reveló que la Ocupación de GFP-Smad2 es sustancialmente superior en los promotores de los genes estudiados respecto al gen *HPRT1* (Figura 65 B). Por lo tanto, estos resultados indican que GFP-Smad2 también se une

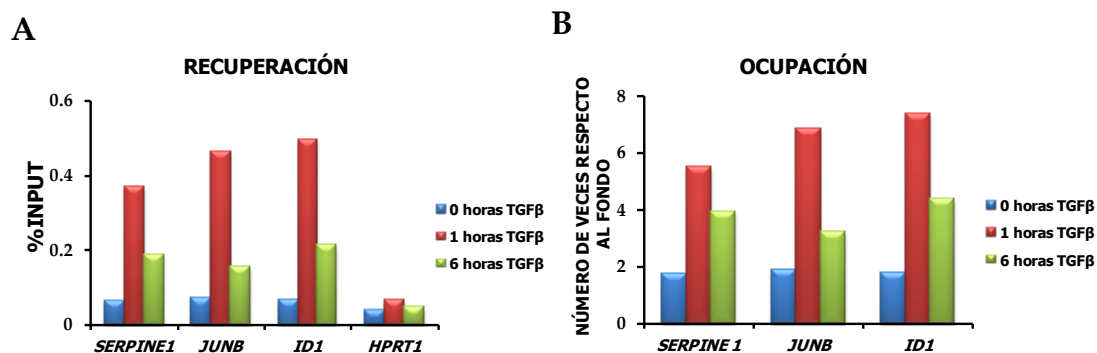


Figura 65. qPCR control de calidad del ChIP. A. Análisis de la Recuperación del ChIP. Se representa el porcentaje de DNA inmunoprecipitado de los promotores de los genes *SERPINE1*, *JUNB*, *ID1* y *HPRT1*, con respecto a la muestra de cromatina sin inmunoprecipitar (%INPUT). B. Análisis de la Ocupación. Se representa el grado de ocupación de Smad2 en los promotores de los genes *SERPINE1*, *JUNB* e *ID1* con respecto a la ocupación residual, refiriéndose a la ocupación del promotor del gen usado como control negativo, *HPRT1* (Número de veces respecto al fondo).

específicamente a secuencias caracterizadas para la unión de Smad2 endógena. Estos datos, junto con los datos provenientes de la caracterización bioquímica y funcional de GFP-Smad2 (20), nos permitió acometer con confianza el siguiente paso que consistió en la secuenciación masiva de las muestras.

La secuenciación masiva de las muestras inmunoprecipitadas se realizó con el secuenciador Illumina Genome Analyzer II. De esta manera obtuvimos los perfiles de unión al DNA de GFP-Smad2 tras la estimulación con TGF β . Los archivos generados en la secuenciación fueron cargados a la página web de UCSC Genome Browser (169). Este sitio web contiene secuencias referenciadas y secuencias provisionalmente ensambladas de una gran colección de genomas. Mediante el uso de esta herramienta, obtuvimos los perfiles de unión de GFP-Smad2 en todo el genoma humano.

Para comprobar la efectividad del ChIP-Seq, utilizando la herramienta USC Genome Browser (169), analizamos el grado de ocupación de GFP-Smad2 en las regiones promotoras de varios genes conocidos por unir Smad2: *SERPINE1*, *JUNB*, *ID1* y *MNT* (213). En la figura 66 se muestran los perfiles de unión de GFP-Smad2 en el entorno de los genes *SERPINE1*, *JUNB*, *ID1* y *MNT*. Como control negativo se muestra la unión de GFP-Smad2 a *HPRT1*. Cada perfil contiene la representación del gen, formado por exones (barras anchas) conectados por intrones (líneas horizontales más delgadas). En cada gráfico se representan los histogramas de los perfiles de unión de GFP-Smad2 en los diferentes tiempos analizados, 0, 1 y 6 horas con TGF β , nombrados en el gráfico como GFPS2_0h, GFPS2_1h y GFPS2_6h, respectivamente. Dichos histogramas representan el número de lecturas de secuenciación de una región específica de DNA inmunoprecipitada para GFP-Smad2. Un mayor número de lecturas indica una mayor ocupación estadística de esa zona por GFP-Smad2 en el DNA de la población de células estudiadas. Todos los parámetros adicionales representados en los perfiles de unión están disponibles en la herramienta web USC Genome Browser (169). Se representan las islas CpG, las cuales típicamente están cerca del comienzo de la transcripción y generalmente están ligadas a las regiones promotoras de genes constitutivos (housekeeping en inglés) de vertebrados (214, 215). El 72% de los promotores de los genes humanos tienen regiones con un alto contenido en CpG (215).

Los sitios hipersensibles a la DNasa I son marcas de cromatina abierta y accesible, e identifican diferentes elementos genéticos reguladores como *enhancers*, silenciadores, promotores, delimitadores o *insulators*, regiones locus control y elementos noveles (216). Un método ampliamente usado para localizar en el genoma elementos reguladores funcionales activos es la identificación de las regiones del genoma que son hipersensibles al corte por DNasa I. El DNasa-Seq es un método que combina la digestión de la cromatina con DNasa I, seguida de la secuenciación de los fragmentos que han sido digeridos por la DNasa I y, finalmente, la identificación de las zonas de la cromatina hipersensibles a la DNasa I (216). En los perfiles de unión de GFP-Smad2 se representan los perfiles de secuenciación del DNasa-Seq de una línea celular de melanocitos. Se eligió ésta, entre otras líneas celulares, debido a la similitud entre estas células y las células HaCaT. Los *enhancers* son identificados por la presencia de la monometilación del residuo de lisina 4 de la histona 3 (H3K4me1) (217). Por otro lado, los promotores de genes activos o preparados para ser activados son identificados por la presencia de la trimetilación del residuo de lisina 4 de la histona 3 (H3K4me3) (217). Estas marcas de histonas sirven para marcar regiones con propiedades de promotores o propiedades de *enhancers*. En los perfiles de unión se representan los niveles de enriquecimiento de las dos marcas de histonas, H3K4me1 y H3K4me3. Los *enhancers* pueden llegar a regular la transcripción de genes que están a varias Kilobases (Kb) de su posición (218). Para simplificar nuestro análisis, las zonas reguladoras que unen GFP-Smad2 hemos asumido que controlan la transcripción del gen más cercano. El análisis de los perfiles de unión de GFP-Smad2 de los genes *SERPINE1*, *JUNB*, *ID1* y *MNT* muestra un mayor número de lecturas, en respuesta al estímulo celular con TGF β , en las zonas identificadas como cromatina abierta (DNasa-Seq), en concreto en las zonas caracterizadas como promotor (H3K4me3) y/o *enhancer* (H3K4me1). En todos los genes estudiados, el número de lecturas es máximo tras una hora de estimulación con TGF β . Estos datos indican claramente una mayor ocupación de GFP-Smad2 en dichas zonas (Figura 66 A-D). En concreto, para el gen *SERPINE1*, GFP-Smad2 presenta una mayor ocupación, tras la estimulación de las células con TGF β , en las zonas caracterizadas como *enhancer* (H3K4me1). La unión de GFP-Smad2 a las zonas caracterizadas como promotor (H3K4me3) aumentan tras la estimulación con TGF β

pero muy débilmente en comparación con la zona caracterizada como *enhancer* (Figura 66 A). Para el gen *JUNB*, GFP-Smad2 también presenta una mayor ocupación, tras la estimulación con TGF β , en las zonas caracterizadas como *enhancer* (H3K4me1). En este caso, la unión de GFP-Smad2 a las zonas caracterizadas como promotor (H3K4me3) aumenta tras la estimulación con TGF β en mayor medida que para el gen *SERPINE1* (Figura 66 B). Por último, para los genes *ID1* y *MNT* la ocupación de GFP-Smad2, tras la estimulación de las células con TGF β , aumenta en las zonas caracterizadas como *enhancer* (H3K4me1) y como promotor (H3K4me3) de manera similar (Figura 66 C, D). En claro contraste, el perfil de unión de GFP-Smad2 en el entorno del gen *HPRT1* muestra un bajo número de lecturas en las zonas caracterizadas como promotor (H3K4me3) y *enhancer* (H3K4me1) tanto antes como durante la estimulación de las células con TGF β , indicando que GFP-Smad2 no se une a ninguna zona de esta región (Figura 66 E), lo que es coherente con los datos en la literatura que indican que Smad2 no se une a sus zonas reguladoras antes o durante el estímulo con TGF β (213). Todos los genes que analizamos, salvo *SERPINE1*, presentan islas CpG en las zonas caracterizadas como promotor (Figura 66 A-E). Para tener una visión más global y poder determinar la especificidad de la unión de Smad2 a secuencias reguladoras, analizamos la unión de GFP-Smad2 al DNA en un entorno más amplio de dos de los genes estudiados anteriormente, *SERPINE1* y *JUNB*. Dicho análisis reveló que GFP-Smad2 se une a las zonas caracterizadas como promotor (H3K4me3) y *enhancer* (H3K4me1) de los genes estudiados: *SERPINE1* y *JUNB*, en una clara distinción con el entorno de 250 y 160 Kb, respectivamente, donde GFP-Smad2 no se une a los promotores/*enhancers* de las regiones adyacentes que incluyen varios genes (Figura 66 F, G). Por lo tanto, la unión de GFP-Smad2 no se encuentra aleatoriamente distribuida por las zonas correspondientes a otros promotores y *enhancers*. Este análisis más amplio de unión, junto con los datos de la ausencia de unión de GFP-Smad2 al gen *HPRT1*, prueba que GFP-Smad2 se une específicamente a los genes *SERPINE1*, *JUNB*, *ID1* y *MNT*. Todos estos datos indican que GFP-Smad2 se une a zonas caracterizadas como promotores y/o *enhancers* de genes que habían sido descritos para Smad2 endógeno y por tanto valida el ChIP realizado por nosotros permitiéndonos estudiar con confianza la unión de Smad2 a muchos otros promotores del estudio.

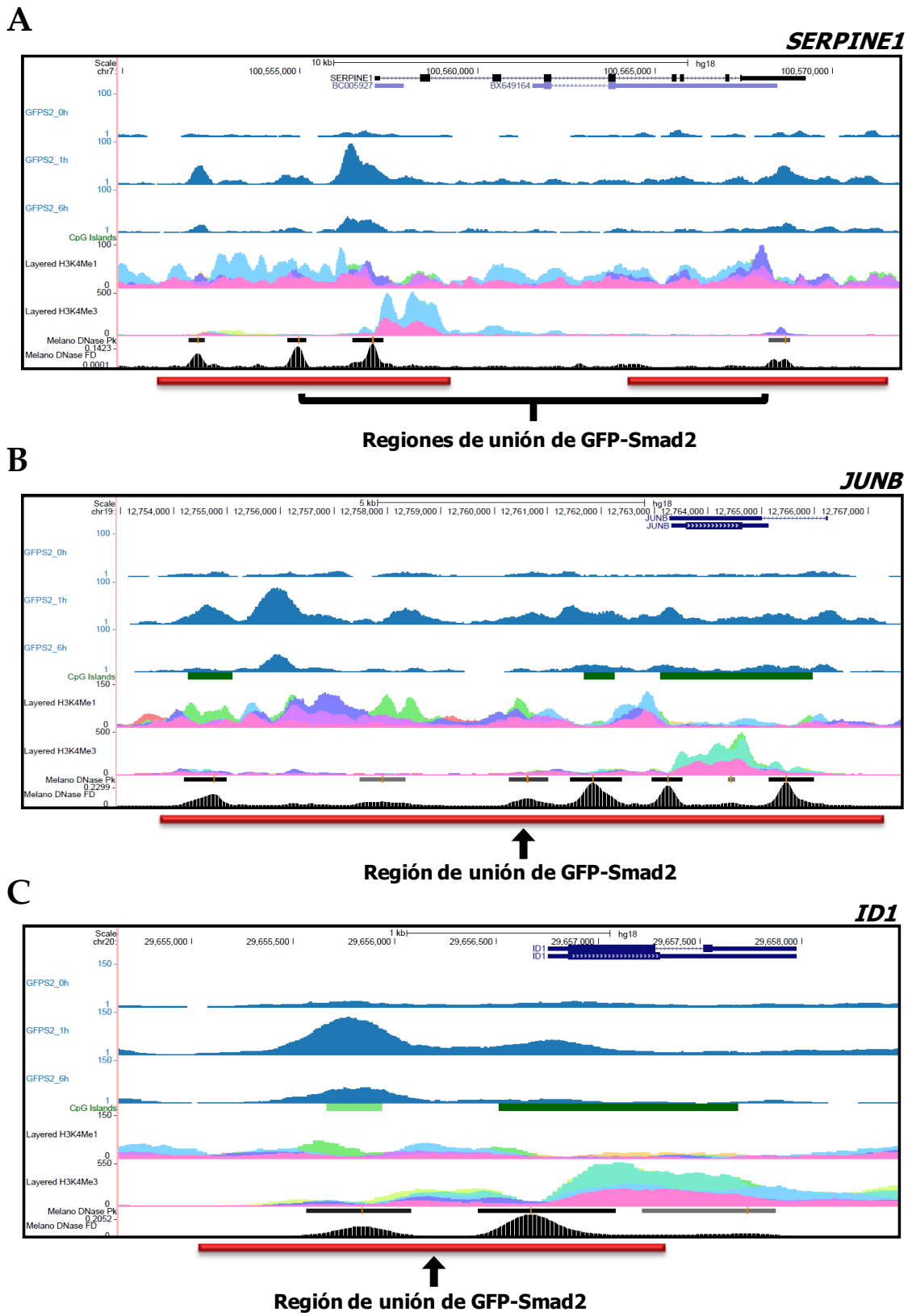


Figura 66.

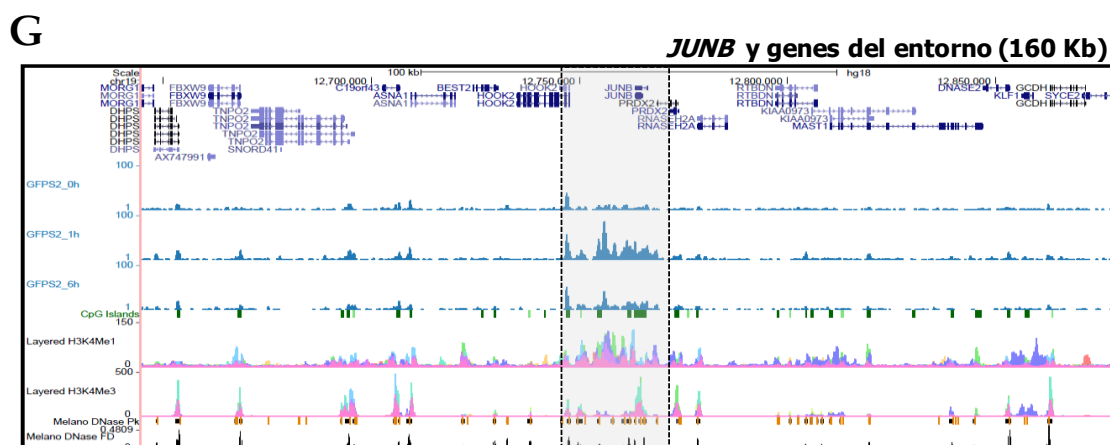


Figura 66. Histogramas de los perfiles de unión de GFP-Smad2 a los genes *SERPINE1*, *JUNB*, *ID1*, *MNT* y *HPRT1*. Se detallan los perfiles de unión de GFP-Smad2 a 0, 1 y 6 horas de estimulación con 2 ng/ml de TGF β de las células HaCaT-GFP-Smad2 para todos los genes analizados. Cada perfil contiene una representación del gen formado por exones (barras anchas) conectados por intrones (líneas horizontales más delgadas). Las regiones 5' y 3' UTR son representadas como barras más finas que el exón, y las cabezas de flechas solapando con los intrones indican la dirección de la transcripción. Para cada uno de los genes se muestran los diferentes transcritos maduros descritos. Bajo el diagrama, se indica con una barra roja las zonas de unión de GFP-Smad2 más destacables. A. Perfil de unión de GFP-Smad2 al DNA que contiene el gen *SERPINE1*. B. Perfil de unión de GFP-Smad2 al DNA que contiene el gen *JUNB*. C. Perfil de unión de GFP-Smad2 al DNA que contiene el gen *ID1*. D. Perfil de unión de GFP-Smad2 al DNA que contiene el gen *MNT*. E. Perfil de unión de GFP-Smad2 al DNA que contiene el gen *HPRT1*. F. Perfil de unión de GFP-Smad2 al DNA en el entorno de 250 Kb del gen *SERPINE1*. G. Perfil de unión de GFP-Smad2 al DNA en el entorno de 160 Kb del gen *JUNB*. F-G. Se destaca con un sombreado gris el entorno próximo correspondiente a los genes *SERPINE1* y *JUNB*, respectivamente. GFPS2_0h: perfil de unión de GFP-Smad2 de células no estimuladas con TGF β . GFPS2_1h: perfil de unión de GFP-Smad2 de células estimuladas 1 hora con TGF β . GFPS2_6h: perfil de unión de GFP-Smad2 de células estimuladas 6 horas con TGF β . Los datos de los diferentes parámetros detallados a continuación están disponibles en la herramienta web Genome Browser (169). CpG island: islas CpG representadas con una barra verde. Layered H3K4me1: monometilación del residuo de lisina 4 de la histona 3 detectada en experimentos de CHIP publicados previamente. Layered H3K4me3: trimetilación del residuo de lisina 4 de la histona 3 detectada en experimentos de CHIP publicados previamente. Melano DNase Pk: región de señal enriquecida de zonas sensibles a la DNasa I. La línea sólida vertical representa el punto con mayor señal. Ensayo realizado en una línea celular de melanocitos. Melano DNase FD: gráfico de densidad del enriquecimiento de la señal para el conjunto combinado de secuencias de todas las réplicas en un ensayo de DNasa I. Ensayo realizado en una línea celular de melanocitos.

III.12.3 Análisis de los resultados del RNA-Seq.

III.12.3.1 Análisis de la unión de GFP-Smad2 a los promotores y/o enhancers de los genes seleccionados tras el filtrado del RNA-Seq.

Quisimos estudiar si, tras la estimulación de las células con TGF β , Smad2 se une a las zonas caracterizadas como promotores y/o enhancers de los genes

seleccionados de los resultados del RNA-Seq, es decir, genes cuya Razón normalizada es mayor a +0,7 o menor a -0,7 y son comunes al tratamiento con EX527 y HR73 (Tabla 37). Para facilitar la nomenclatura de los diferentes grupos de genes establecidos durante el análisis del RNA-Seq, se denominaron grupo 1 y 2 a los genes cuya Razón es mayor a +0,7 a 1 y 6 horas, respectivamente, de tratamiento con TGFβ, y grupo 3 y 4 a los genes cuya Razón es menor a -0,7 a 1 y 6 horas, respectivamente, de tratamiento con TGFβ (Tabla 38). Utilizamos la herramienta web UCSC Genome Browser (169) y los datos obtenidos del ChIP-Seq para analizar la unión de GFP-Smad2. Evaluamos en este conjunto de genes, la presencia o ausencia de GFP-Smad2 en las zonas caracterizadas como promotores (H3K4me3) y/o *enhancers* (H3K4me1) tras la estimulación de las células con TGFβ. Tras este análisis, seleccionamos los genes donde la estimulación con TGFβ incrementa la unión de GFP-Smad2 a dichas zonas. De todos los genes analizados, encontramos un 37 y 36% para los grupos 1 y 2, respectivamente, y un 46 y 55% de genes para los grupos 3 y 4, respectivamente, donde se incrementaba la unión de GFP-Smad2 a sus promotores (H3K4me3) y/o *enhancers* (H3K4me1), tras la estimulación de las células con TGFβ (Tabla 38). Estos datos indican que Smad2 está implicado en la transcripción dependiente de TGFβ de aproximadamente un 50% de los genes seleccionados de cada grupo. Éstos son genes cuya transcripción está modificada de manera sustancial por la inhibición de Sirt1, su Razones ($\log_2 (NE_{\text{InhibidorTx}}/NE_{\text{DMSOTx}})$) normalizada es mayor a +0,7 o menor a -0,7 (ver apartado III.12.1). Por tanto, estos datos sugieren fuertemente una implicación conjunta de Smad2 y Sirt1 en la transcripción de estos genes.

GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4
$\log_2 (NE_{\text{Inhibidor1h}}/NE_{\text{DMSO1h}}) > +0,7$	$\log_2 (NE_{\text{Inhibidor6h}}/NE_{\text{DMSO6h}}) > +0,7$	$\log_2 (NE_{\text{Inhibidor1h}}/NE_{\text{DMSO1h}}) < -0,7$	$\log_2 (NE_{\text{Inhibidor6h}}/NE_{\text{DMSO6h}}) < -0,7$
1h TGFβ	6h TGFβ	1h TGFβ	6h TGFβ
37%	36%	46%	55%

Tabla 38. Porcentaje de genes seleccionados tras el filtrado de los resultados del RNA-Seq (Tabla 37) que presentan un aumento en la unión de GFP-Smad2 con la estimulación con TGFβ en su zona de DNA caracterizada como promotor/enhancer. Se detalla el porcentaje de cada uno de los grupos: $\log_2 (NE_{\text{InhibidorTx}}/NE_{\text{DMSOTx}}) > +0,7$ y $\log_2 (NE_{\text{InhibidorTx}}/NE_{\text{DMSOTx}}) < -0,7$ a 1 hora y 6 horas de tratamiento con TGFβ.

III.12.3.2 Estudio de la duración del efecto antagónico sobre la transcripción de genes dependiente de TGF β provocado por la inhibición de Sirt1.

Los genes obtenidos tras el filtrado realizado de los resultados del RNA-Seq (Tabla 37), están seleccionados porque muestran una acusada diferencia de expresión entre el tratamiento con el inhibidor de Sirt1 y la muestra sin inhibición a 1 ó 6 horas de tratamiento con TGF β , es decir, su valor de Razón normalizada a 1 ó 6 horas de tratamiento con TGF β ($\log_2 (NE_{\text{Inhibidor1h ó 6h}}/NE_{\text{DMSO1h ó 6h}})$) es mayor de +0,7 o menor de -0,7. Sin embargo, en su selección no se requería que ambos valores de Razón, a 1 y 6 horas de tratamiento con TGF β , cumplieran con esa condición. Quisimos analizar si el efecto de Sirt1 se mantiene similar a 1 y 6 horas de la estimulación con TGF β para un mismo gen o si por el contrario es un efecto transitorio que no se prolonga en el tiempo. Este análisis se realizó sobre los genes que cumplen las condiciones de los filtrados de los resultados del RNA-Seq y que además unen GFP-Smad2 a sus zonas caracterizadas como promotor/*enhancer* tras la estimulación con TGF β (Tabla 38). Se analizó si la diferencia de expresión entre la muestra con el inhibidor de Sirt1 y la muestra control a 1 hora de tratamiento con TGF β correlacionaba con diferencias de expresión acusadas a las 6 horas de tratamiento y viceversa. De los genes seleccionados previamente que presentan una diferencia de expresión acusada entre la muestra con inhibidor de Sirt1 y la muestra control a 1 hora de tratamiento con TGF β , es decir, los genes cuyo valor de Razón ($\log_2 (NE_{\text{Inhibidor1h}}/NE_{\text{DMSO1h}})$) normalizada es mayor a +0,7 o menor a -0,7 (grupo 1 y 3, tabla 38), se seleccionaron los genes que a 6 horas de tratamiento con TGF β , su valor de Razón ($\log_2 (NE_{\text{Inhibidor6h}}/NE_{\text{DMSO6h}})$) es mayor a +0,5 o menor a -0,5, respectivamente, con el tratamiento de al menos uno de los dos inhibidores de Sirt1. Tras este análisis, encontramos un 66% de genes para el grupo 1 y 76% para el grupo 3, que a las 6 horas de tratamiento persiste la diferencia de expresión entre ambas muestras (Tabla 39). Aunque en ocasiones esa diferencia no es tan marcada como la que se observa en la muestra de 1 hora de tratamiento, ésta sigue siendo elevada. Por otro lado, de los genes seleccionados previamente que presentan una diferencia de expresión acusada entre la muestra con inhibidor de Sirt1 y la muestra control a las 6 horas de tratamiento con TGF β , es decir, genes cuyo valor de Razón ($\log_2 (NE_{\text{Inhibidor6h}}/NE_{\text{DMSO6h}})$) normalizada es mayor a +0,7 o menor a -0,7 (grupo 2

y 4, tabla 38), se seleccionaron los genes que a la hora de tratamiento con TGFβ, su valor de Razón ($\log_2(\text{NE}_{\text{Inhibidor1h}}/\text{NE}_{\text{DMSO1h}})$) normalizada es mayor a +0,5 o menor a -0,5, respectivamente, con el tratamiento de al menos uno de los dos inhibidores de Sirt1. Tras este análisis, encontramos un 58% de genes para el grupo 2, y 83% de genes para el grupo 4, que a la hora de tratamiento ya se detecta esa diferencia de expresión, aunque no sea tan patente como a las 6 horas (Tabla 39). Ambos análisis indican que, aunque haya genes donde el efecto más pronunciado del inhibidor de Sirt1 sea a 1 hora con TGFβ (grupo 1 y 3, tabla 38) y otros a 6 horas del tratamiento (grupo 2 y 4, tabla 38), hay una mayoría de genes donde el efecto antagónico de la respuesta a TGFβ provocado por el inhibidor de Sirt1 se detecta extendido a tiempos cortos y largos. Todo esto sugiere que el efecto antagónico de la inhibición de Sirt1 sobre la transcripción de genes dependientes de TGFβ es un efecto persistente en el tiempo.

GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4
$\log_2(\text{NE}_{\text{Inhibidor1h}}/\text{NE}_{\text{DMSO1h}}) > +0,7$	$\log_2(\text{NE}_{\text{Inhibidor6h}}/\text{NE}_{\text{DMSO6h}}) > +0,7$	$\log_2(\text{NE}_{\text{Inhibidor1h}}/\text{NE}_{\text{DMSO1h}}) < -0,7$	$\log_2(\text{NE}_{\text{Inhibidor6h}}/\text{NE}_{\text{DMSO6h}}) < -0,7$
1h TGFβ	6h TGFβ	1h TGFβ	6h TGFβ
66%	58%	76%	83%

Tabla 39. Porcentaje de genes donde GFP-Smad2 se une a la zona caracterizada como promotor/enhancer tras la estimulación de las células con TGFβ (Tabla 38) y el efecto antagónico de los inhibidores de Sirt1 es persistente a lo largo del tratamiento con dicha citoquina. Se detalla el porcentaje de cada grupo: $\log_2(\text{NE}_{\text{InhibidorTx}}/\text{NE}_{\text{DMSOTx}}) > +0,7$ y $\log_2(\text{NE}_{\text{InhibidorTx}}/\text{NE}_{\text{DMSOTx}}) < -0,7$ a 1 hora y 6 horas de tratamiento con TGFβ.

III.12.3.3 Representación gráfica del efecto de la inhibición de Sirt1 sobre la transcripción de genes dependiente de TGFβ. Efecto de la inhibición de Sirt1 a todos los tiempos.

Hasta ahora, nos hemos centrado en la regulación de la expresión génica inducida por TGFβ a tiempos cortos, 1 hora, y a tiempos largos, 6 horas, y el efecto de la inhibición de Sirt1 en esos tiempos. Para tener una visión más completa del efecto de los inhibidores de Sirt1 en un tiempo más amplio, seleccionamos 5 genes de cada grupo (grupos 1-4) de la lista de genes donde GFP-Smad2 se une a la zona caracterizada como promotor/enhancer tras la estimulación de las células con TGFβ (Tabla 38) y se representó su curva de expresión en respuesta a TGFβ en presencia o

ausencia de los inhibidores de Sirt1, representando además un tiempo adicional que no se usó para la selección de los genes (2 horas de tratamiento con TGF β). Para la selección de los 5 genes del conjunto de genes que unen Smad2 a sus zonas promotoras (Tabla 38), se tuvo en cuenta el efecto de los inhibidores EX527 y HR73 sobre la transcripción regulada por TGF β en las horas de tratamiento donde habían sido seleccionados previamente: 1 hora para los grupos 1 y 3; y 6 horas para los grupos 2 y 4. Se seleccionaron los genes que presentaban un efecto más acusado de ambos inhibidores. Tras el análisis del efecto de los inhibidores de Sirt1 sobre la transcripción regulada por TGF β de estos genes, se seleccionaron los genes indicados en la tabla 40.

GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4
Log ₂ (NE _{Inhibidor1h} /NE _{DMSO1h})>+0,7	Log ₂ (NE _{Inhibidor6h} /NE _{DMSO6h})>+0,7	Log ₂ (NE _{Inhibidor1h} /NE _{DMSO1h})<-0,7	Log ₂ (NE _{Inhibidor6h} /NE _{DMSO6h})<-0,7
1h TGF β	6h TGF β	1h TGF β	6h TGF β
CCDC34	CFL2	CDK3	ANKRD9
CITED4	HUS1	SBBI54	C9orf16
HOXC9	INSIG2	LOH12CR1	MT1X
TMEM238	MKL2	PDGFA	RILP
SNRNP35	TMEM41A	SPATA24	TRAPPC6A

Tabla 40. Selección de 5 genes de cada uno de los grupos de genes donde GFP-Smad2 se une a la zona caracterizada como promotor/*enhancer* tras la estimulación de las células con TGF β (grupos 1-4, tabla 38). Se detalla el nombre de los 5 genes seleccionados de cada grupo: log₂ (NE_{InhibidorTx}/NE_{DMSOTx})>+0,7 y log₂ (NE_{InhibidorTx}/NE_{DMSOTx})<-0,7 a 1 hora y 6 horas de tratamiento con TGF β .

Como hemos comentado previamente, GFP-Smad2 se une a las zonas caracterizadas como promotor/*enhancer* en el entorno de los 5 genes seleccionados de cada grupo (Tabla 40). Mostramos gráficamente el análisis de unión de GFP-Smad2 a los promotores/*enhancers* de un gen de cada uno de los grupos de la tabla 40: *HOXC9*, *MKL2*, *CDK3* y *ANKRD9* (Figura 67). El análisis de los perfiles de unión de GFP-Smad2 muestra un número mayor de lecturas, cuando las células son estimuladas con TGF β , en las zonas identificadas como cromatina abierta (DNasa-Seq), en concreto las zonas caracterizadas como promotor (H3K4me3) y *enhancer* (H3K4me1), en el entorno de estos cuatro genes mostrando un valor máximo a la hora de estimulación (Figura 67). Esto indica una mayor ocupación de GFP-Smad2 en las zonas caracterizadas como promotor/*enhancer* de dichos genes inducida por la estimulación de las células con

TGFβ. Para estos cuatro genes, la ocupación de GFP-Smad2 en células estimuladas con TGFβ aumenta de manera similar en las zonas caracterizadas como promotor (H3K4me3) y *enhancer* (H3K4me1) (Figura 67).

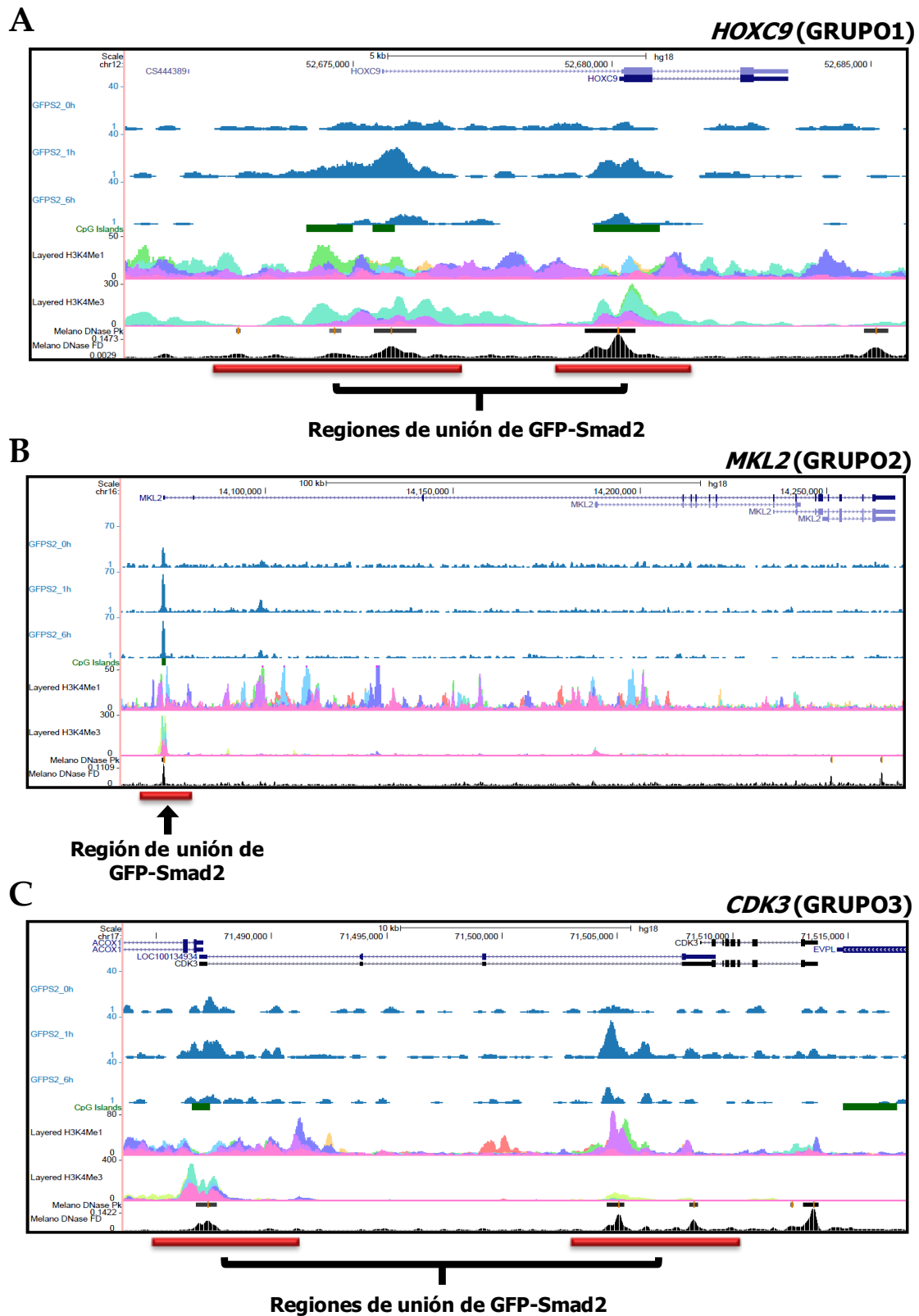


Figura 67.

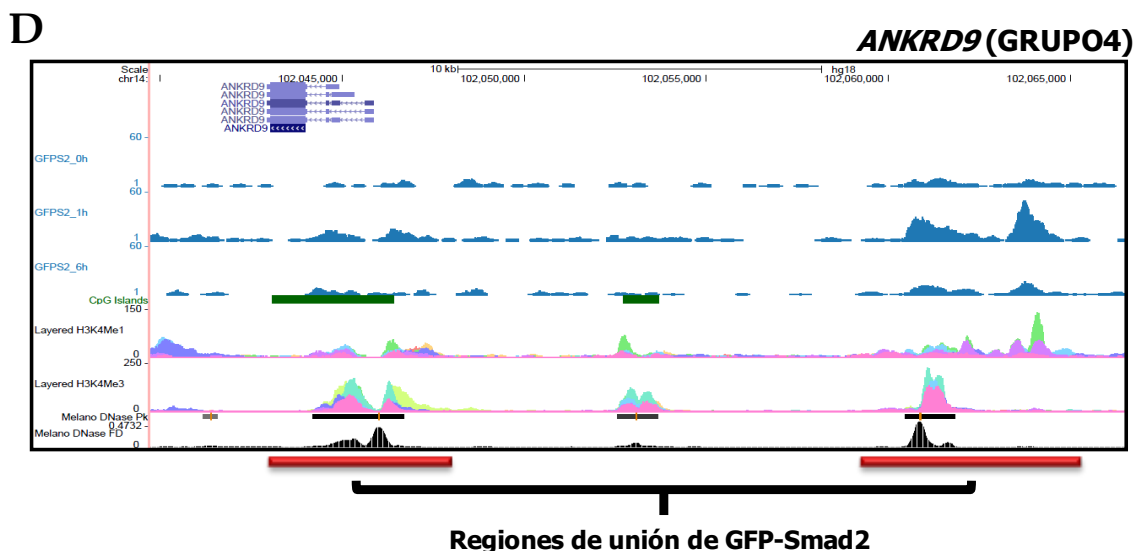


Figura 67. Histogramas de los perfiles de unión de GFP-Smad2 a los genes *HOXC9*, *MKL2*, *CDK3* y *ANKRD9*. Para todos los genes analizados se detallan los perfiles de unión de GFP-Smad2 a 0, 1 y 6 horas de estimulación con 2 ng/ml de TGF β de las células HaCaT-GFP-Smad2. A. Perfil de unión de GFP-Smad2 al DNA que contiene el gen *HOXC9* (Grupo1). B. Perfil de unión de GFP-Smad2 al DNA que contiene el gen *MKL2* (Grupo2). C. Perfil de unión de GFP-Smad2 al DNA que contiene el gen *CDK3* (Grupo3). D. Perfil de unión de GFP-Smad2 al DNA que contiene el gen *ANKRD9* (Grupo4). Para detalles de la figura, ver pie de figura 66.

Representamos gráficamente el efecto del inhibidor de Sirt1 sobre la expresión dependiente de TGF β en la selección de 5 genes para cada grupo mostrada anteriormente (Tabla 40). Se representaron las variaciones de expresión obtenidas en el RNA-Seq para dichos genes con los tratamientos con EX527 y HR73, o el control (DMSO) (Figuras 68-71). Los genes seleccionados de los grupos cuyo valor de Razón ($\log_2(N_{E_{\text{InhibidorTx}}}/N_{E_{\text{DMSOTx}}})$) normalizada es mayor a +0,7 tanto a 1 hora como a 6 horas de tratamiento con TGF β (grupos 1 y 2, tabla 40) son genes cuya expresión es inhibida por TGF β (Figura 68, 69). En cada uno de los tratamientos con los inhibidores de Sirt1, se antagoniza la inhibición de la expresión de dichos genes mayoritariamente a todos los tiempos (*CCDC34*, *CITED4*, *HOXC9*, *TMEM238*, *SNRNP35*, *CFL2*, *HUS1*, *INSIG2*, *MKL2* y *TMEM41A*) (Figura 68, 69). Por otro lado, los genes seleccionados de los grupos cuyo valor de Razón ($\log_2(N_{E_{\text{InhibidorTx}}}/N_{E_{\text{DMSOTx}}})$) normalizada es menor a -0,7 tanto a 1 hora como a 6 horas de tratamiento con TGF β (grupos 3 y 4, tabla 40), son genes cuya expresión es inducida por TGF β (Figura 70, 71). En cada uno de los tratamientos con los inhibidores se produce una inhibición de la activación de la

expresión de dichos genes en todos los tiempos (*CDK3*, *SBBI54*, *LOH12CR1*, *PDGFA*, *SPATA24*, *ANKRD9*, *C9orf16*, *MT1X*, *RILP* y *TRAPPC6A*) (Figura 70, 71). Como ya hemos comentado, la mayor diferencia de expresión entre la muestra tratada con los inhibidores y la muestra control coincide con las horas de tratamiento de TGFβ donde

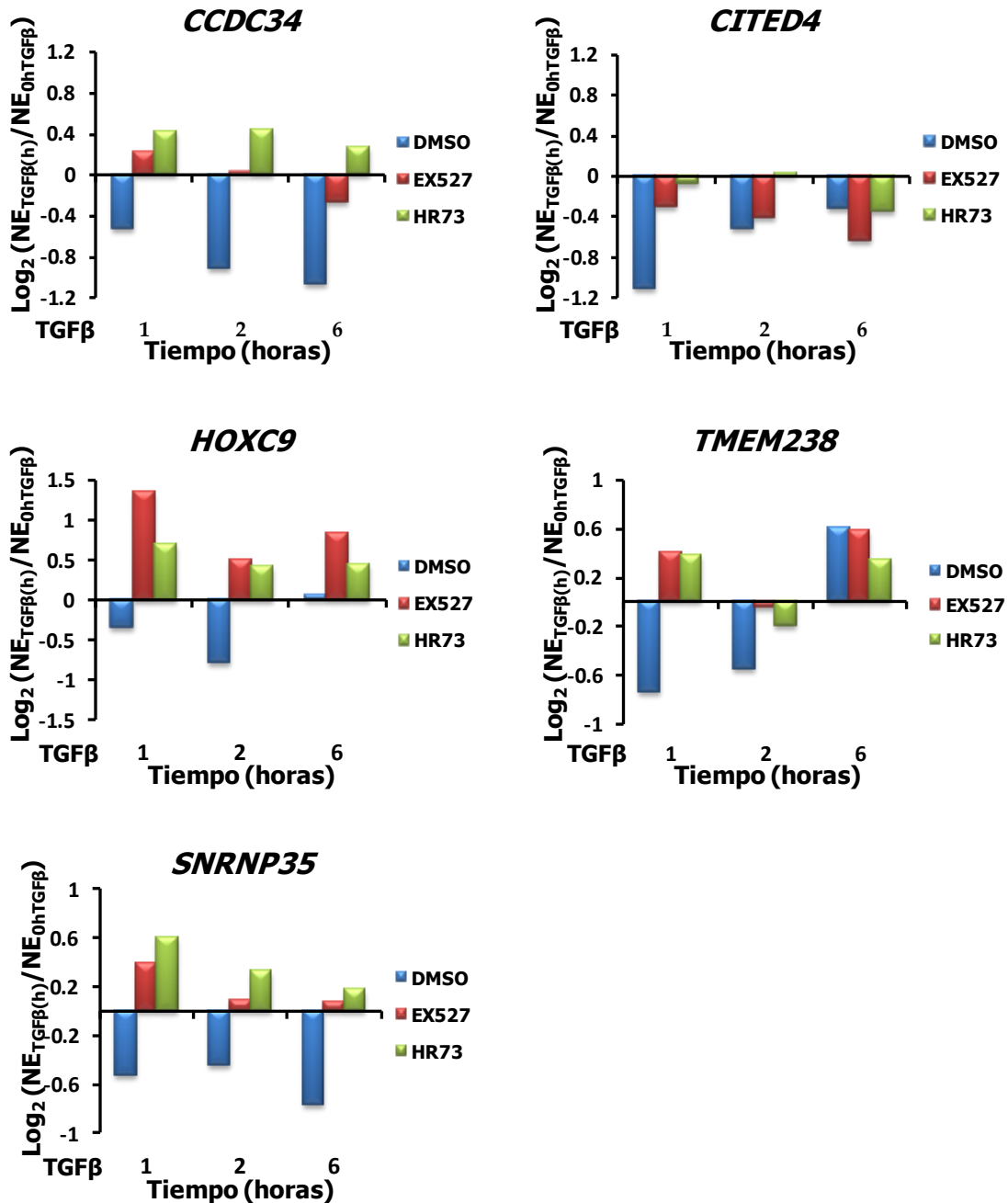


Figura 68. Efecto de los inhibidores EX527 y HR73 sobre la expresión regulada por TGFβ de los genes con $\log_2(NE_{\text{InhibidorTx}}/NE_{\text{DMSOTx}}) > +0,7$ a 1 hora con TGFβ (grupo 1, tabla 40). Datos RNA-Seq. Se representa la variación de la expresión de los genes *CCDC34*, *CITED4*, *HOXC9*, *TMEM238* y *SNRNP35* a 1, 2 y 6 horas de estimulación con TGFβ con respecto a 0 horas con TGFβ en el control (DMSO) y los tratamientos con EX527 y HR73. La variación de la expresión se representa como el $\log_2(NE_{1h \text{ ó } 2h \text{ ó } 6hTGF\beta}/NE_{0hTGF\beta})$.

su valor de Razón normalizada superaba +0,7 o era inferior a -0,7: 1 hora para los grupos 1 y 3, y 6 horas para los grupo 2 y 4. Sin embargo, podemos comprobar que el efecto antagónico producido por los inhibidores de Sirt1 no se limita a esas horas sino que es un efecto que se extiende a otros tiempos. En los ejemplos seleccionados, este

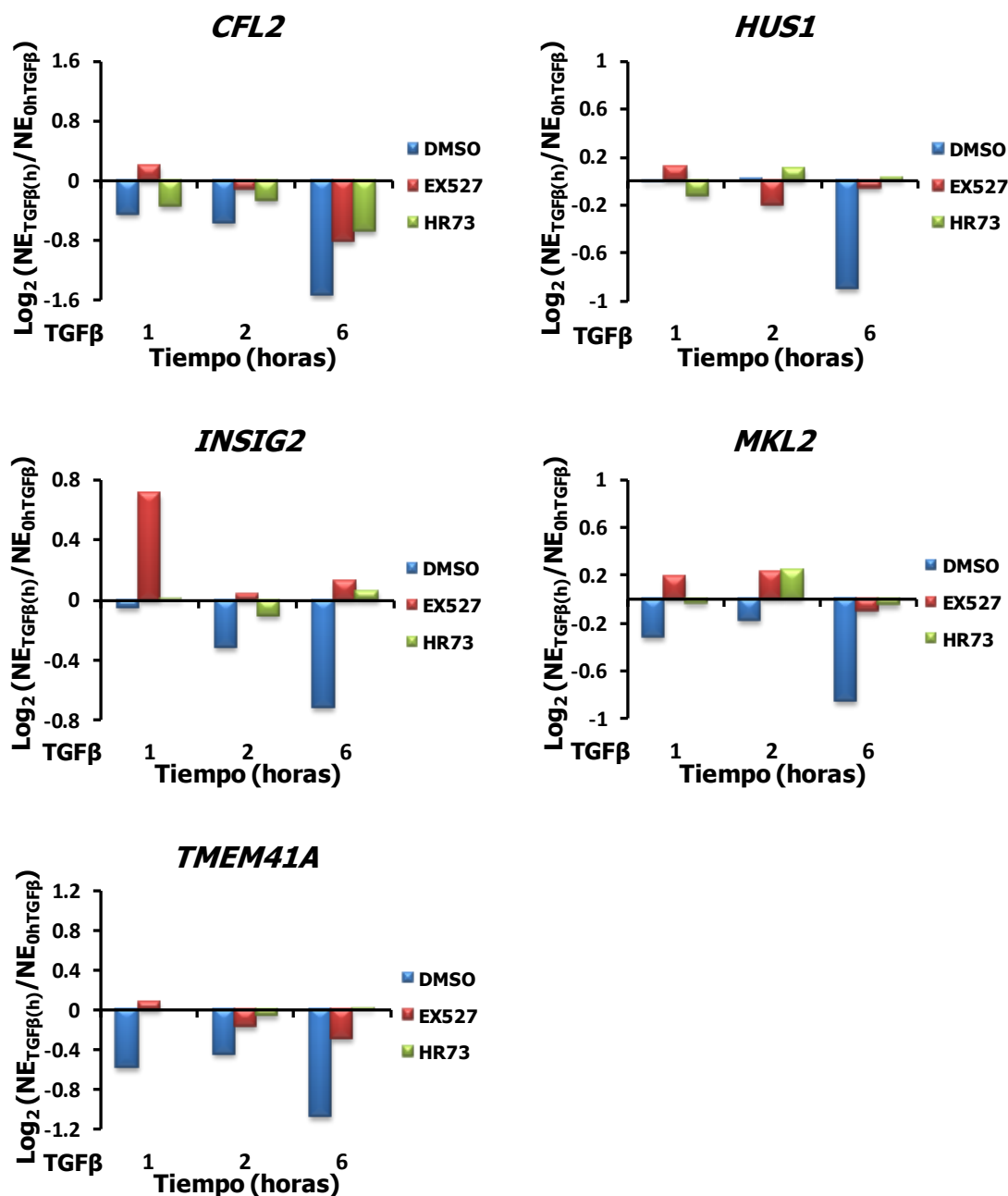


Figura 69. Efecto de los inhibidores EX527 y HR73 sobre la expresión regulada por TGFβ de los genes con $\log_2 (NE_{\text{InhibidorTx}}/NE_{\text{DMSOTx}}) > +0,7$ a 6 horas con TGFβ (grupo 2, tabla 40). Datos RNA-Seq. Se representa la variación de la expresión de los genes *CFL2*, *HUS1*, *INSIG2*, *MKL2* y *TMEM41A* a 1, 2 y 6 horas de estimulación con TGFβ con respecto a 0 horas con TGFβ en el control (DMSO) y los tratamientos con EX527 y HR73. La variación de la expresión se representa como el $\log_2 (NE_{1h \text{ ó } 2h \text{ ó } 6hTGF\beta}/NE_{0hTGF\beta})$.

efecto lo vemos sobretodo en los genes *CCDC34*, *HOXC9* y *SNRNP35* del grupo 1 (Figura 68), los genes *INSIG2*, *MKL2* y *TMEM41A* del grupo 2 (Figura 69), los genes *CDK3*, *LOH12CR1*, *PDGFA* y *SPATA24* del grupo 3 (Figura 70) y los genes *ANKRD9*, *C9orf16*, *RILP* y *TRAPPC6A* del grupo 4 (Figura 71).

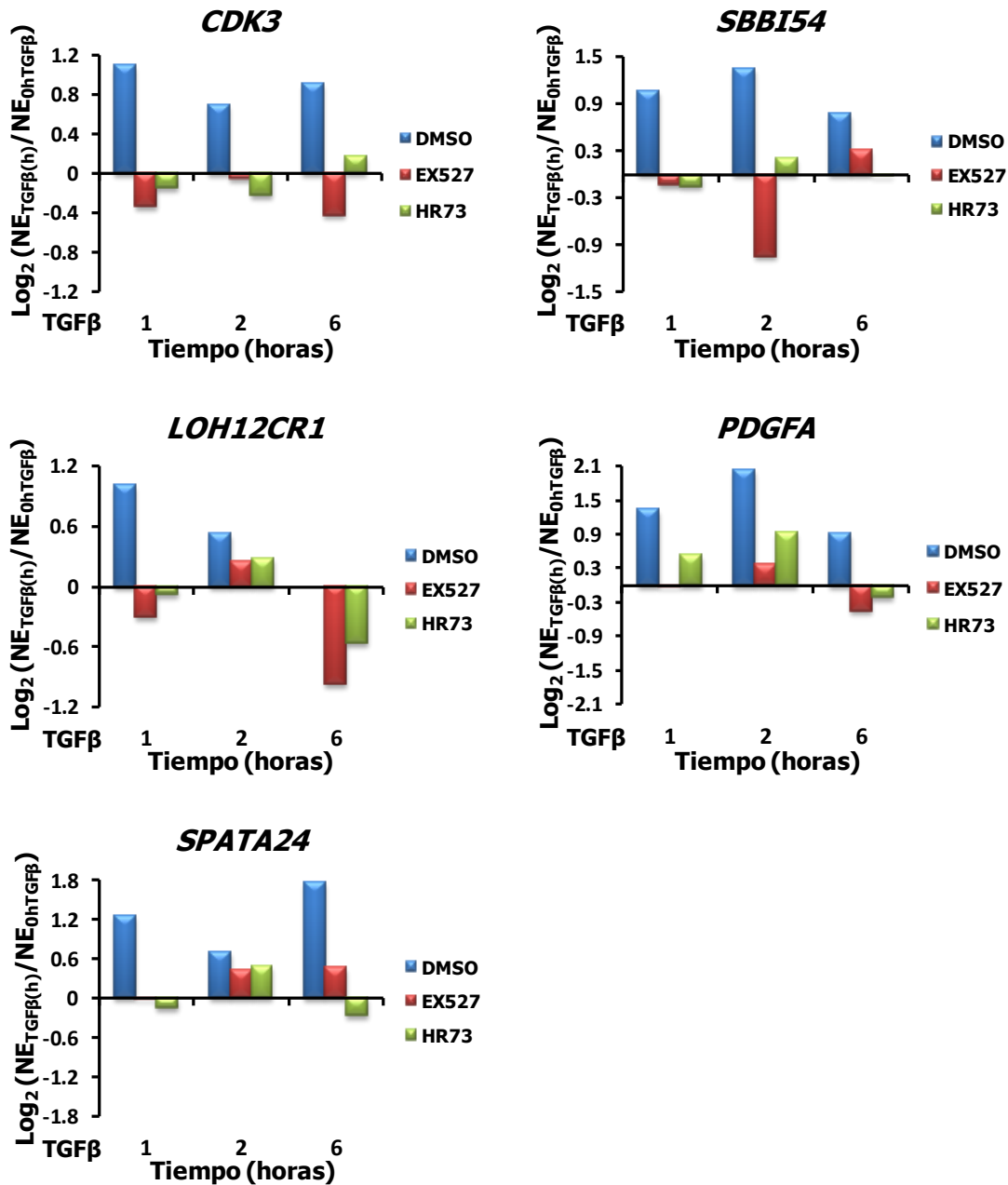


Figura 70. Efecto de los inhibidores EX527 y HR73 sobre la expresión regulada por TGFβ de los genes con $\log_2 (NE_{\text{InhibidorTx}}/NE_{\text{DMSOTx}}) < -0,7$ a 1 hora con TGFβ (grupo 3, tabla 40). Datos RNA-Seq. Se representa la variación de la expresión de los genes *CDK3*, *SBB154*, *LOH12CR1*, *PDGFA* y *SPATA24* a 1, 2 y 6 horas de estimulación con TGFβ con respecto a 0 horas con TGFβ en el control (DMSO) y los tratamientos con EX527 y HR73. La variación de la expresión se representa como el $\log_2 (NE_{1h \text{ ó } 2h \text{ ó } 6hTGF\beta}/NE_{0hTGF\beta})$.

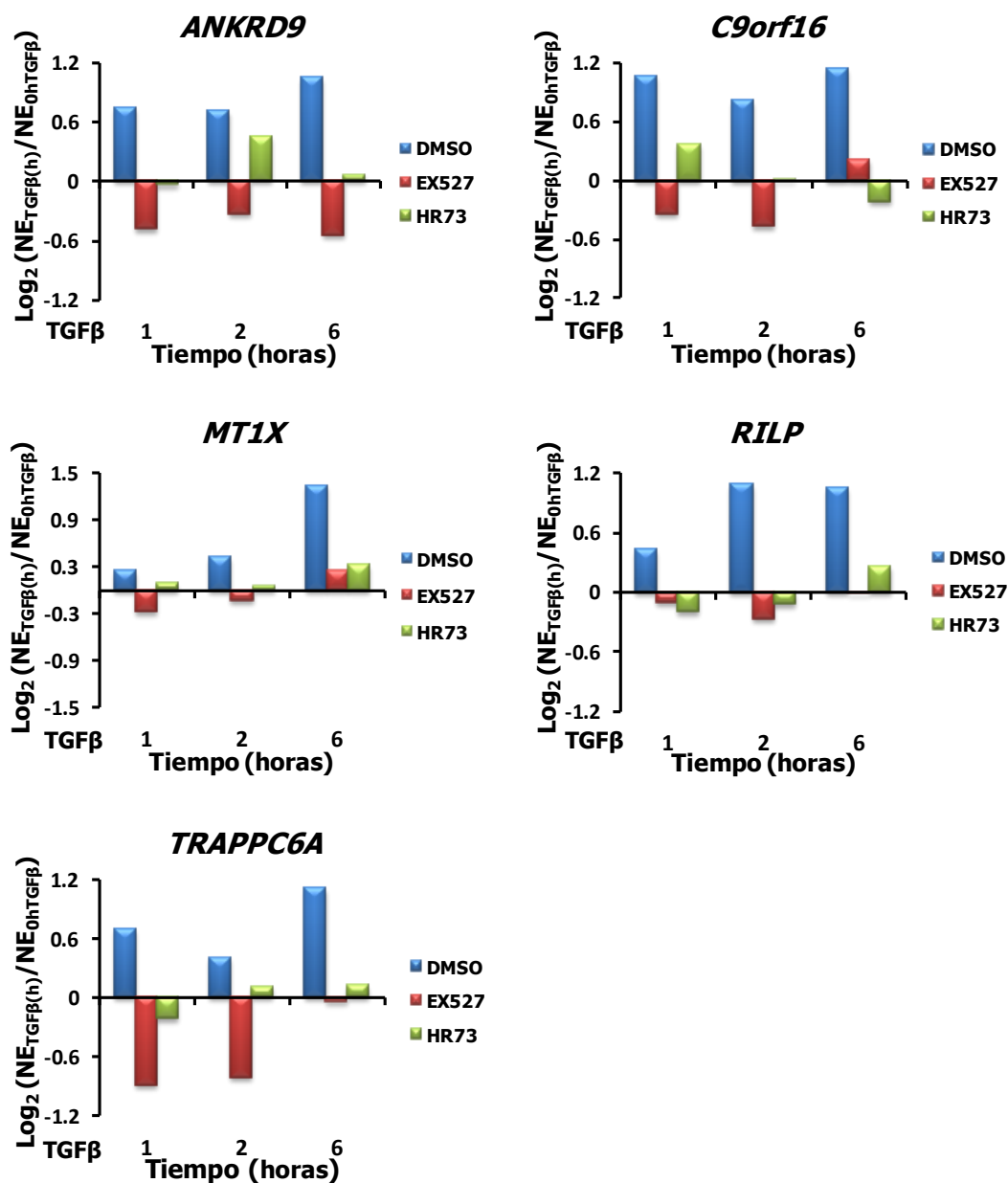


Figura 71. Efecto de los inhibidores EX527 y HR73 sobre la expresión regulada por TGFβ de los genes con $\log_2 (NE_{\text{InhibidorTx}}/NE_{\text{DMSOTx}}) < -0,7$ a 6 horas con TGFβ (grupo 4, tabla 40). Datos RNA-Seq. Se representa la variación de la expresión de los genes ANKRD9, C9orf16, MT1X, RILP y TRAPPC6A a 1, 2 y 6 horas de estimulación con TGFβ con respecto a 0 horas con TGFβ en el control (DMSO) y los tratamientos con EX527 y HR73. La variación de la expresión se representa como el $\log_2 (NE_{1h \text{ ó } 2h \text{ ó } 6hTGF\beta} / NE_{0hTGF\beta})$.

III.12.3.4 ¿Es el efecto de la inhibición de Sirt1 un efecto general sobre la transcripción?

Cabía la posibilidad de que el efecto antagónico de los inhibidores de Sirt1 sobre la transcripción de los genes dependientes de TGFβ pudiera ser un efecto general

sobre la transcripción. Estudiamos un grupo de genes caracterizados por ser su expresión estimulada o inhibida por TGFβ (62) y que no habían sido seleccionados por el análisis de los datos del RNA-Seq. Estudiamos la variación de la expresión entre la muestra control (DMSO) y la muestra con los inhibidores de Sirt1 de los genes *CDKN1A*, *PMEPAI* (*TMEPAI*) y *SMAD7* cuya transcripción es activada por TGFβ (Figura 72) y los genes *ID3*, *FOXQ1* y *RASSF5* cuya transcripción es inhibida por TGFβ (Figura 73). El análisis de los resultados del RNA-Seq reveló la existencia de genes que responden a TGFβ cuya transcripción no es afectada significativamente por ninguno de los dos inhibidores de Sirt1 (Figura 72, 73). Estos resultados sugieren que el efecto de la inhibición de Sirt1 sobre genes dependiente de TGFβ no es un efecto general sobre la transcripción sino específico para determinados genes. Además, estos resultados proveen de un conjunto de genes donde el efecto de la inhibición de Sirt1 es mínimo e indican que el análisis de los resultados del RNA-Seq ha permitido determinar la existencia de un grupo de genes que son regulados por Sirt1.

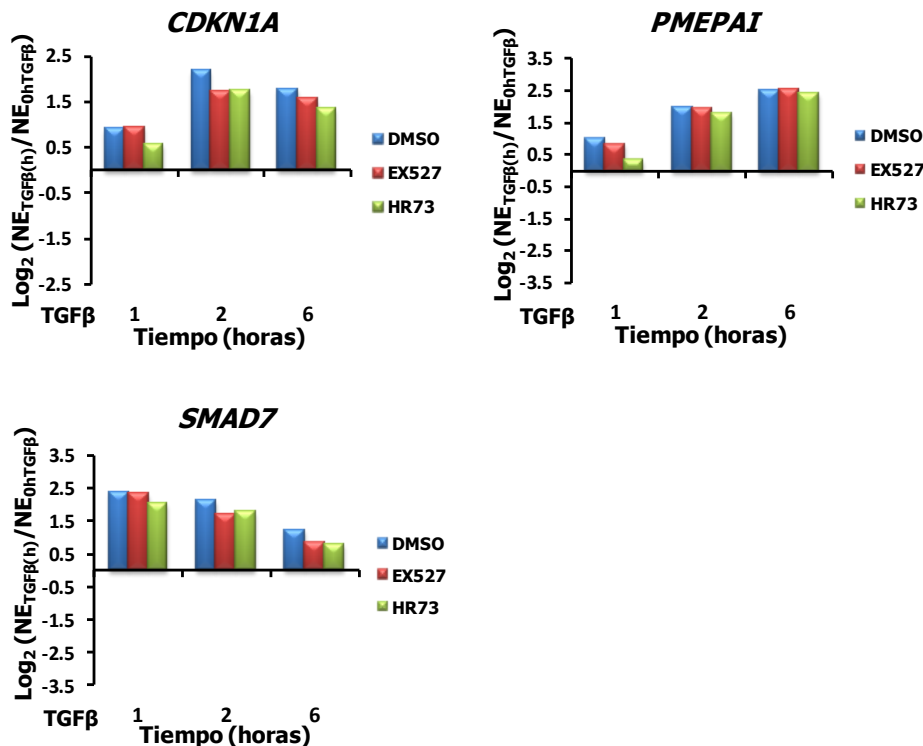


Figura 72. Efecto de los inhibidores EX527 y HR73 sobre la expresión regulada por TGFβ de los genes *CDKN1A*, *PMEPAI* y *SMAD7*. Datos RNA-Seq. Se representa la variación de la expresión de los genes *CDKN1A*, *PMEPAI* y *SMAD7* a 1, 2 y 6 horas de estimulación con TGFβ con respecto a 0 horas con TGFβ en el control (DMSO) y los tratamientos con EX527 y HR73. La variación de la expresión se representa como el $\log_2 (NE_{1h} \delta 2h \delta 6hTGF\beta / NE_{0hTGF\beta})$.

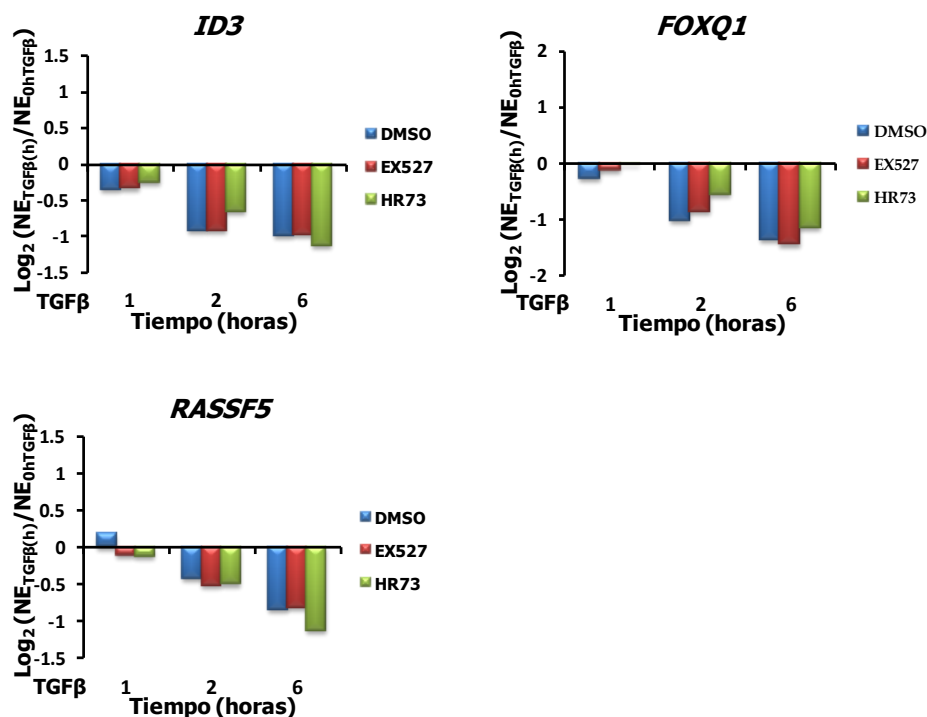


Figura 73. Efecto de los inhibidores EX527 y HR73 sobre la expresión regulada por TGF β de los genes *ID3*, *FOXQ1* y *RASSF5*. Datos RNA-Seq. Se representa la variación de la expresión de los genes *ID3*, *FOXQ1* y *RASSF5* a 1, 2 y 6 horas de estimulación con TGF β con respecto a 0 horas con TGF β en el control (DMSO) y los tratamientos con EX527 y HR73. La variación de la expresión se representa como el $\log_2 (NE_{TGF\beta}(h)/NE_{0hTGF\beta})$.

Por otro lado, utilizando los datos procedentes del ChIP-Seq analizamos si GFP-Smad2 se une a las zonas reguladoras de estos genes. El análisis de los perfiles de unión a GFP-Smad2 de dichos genes muestra un número mayor de lecturas en las zonas identificadas como cromatina abierta (DNase-Seq), y en particular en las zonas caracterizadas como promotor (H3K4me3) y *enhancer* (H3K4me1), en respuesta al estímulo de TGF β , con un valor máximo a la hora de estimulación (Figura 74, 75). Esto indica una mayor ocupación de GFP-Smad2 en los promotores de dichos genes en respuesta al tratamiento con TGF β . Además, estos datos sugieren que Smad2 se une a los promotores/*enhancers* de estos genes para regular su transcripción, aunque ésta no se afecta por la inhibición de la actividad catalítica de Sirt1. Por lo tanto, no todos los genes dependientes de TGF β cuyas zonas reguladoras son ocupadas por Smad2, parecen llevar asociada la participación de Sirt1 en la regulación de la transcripción.

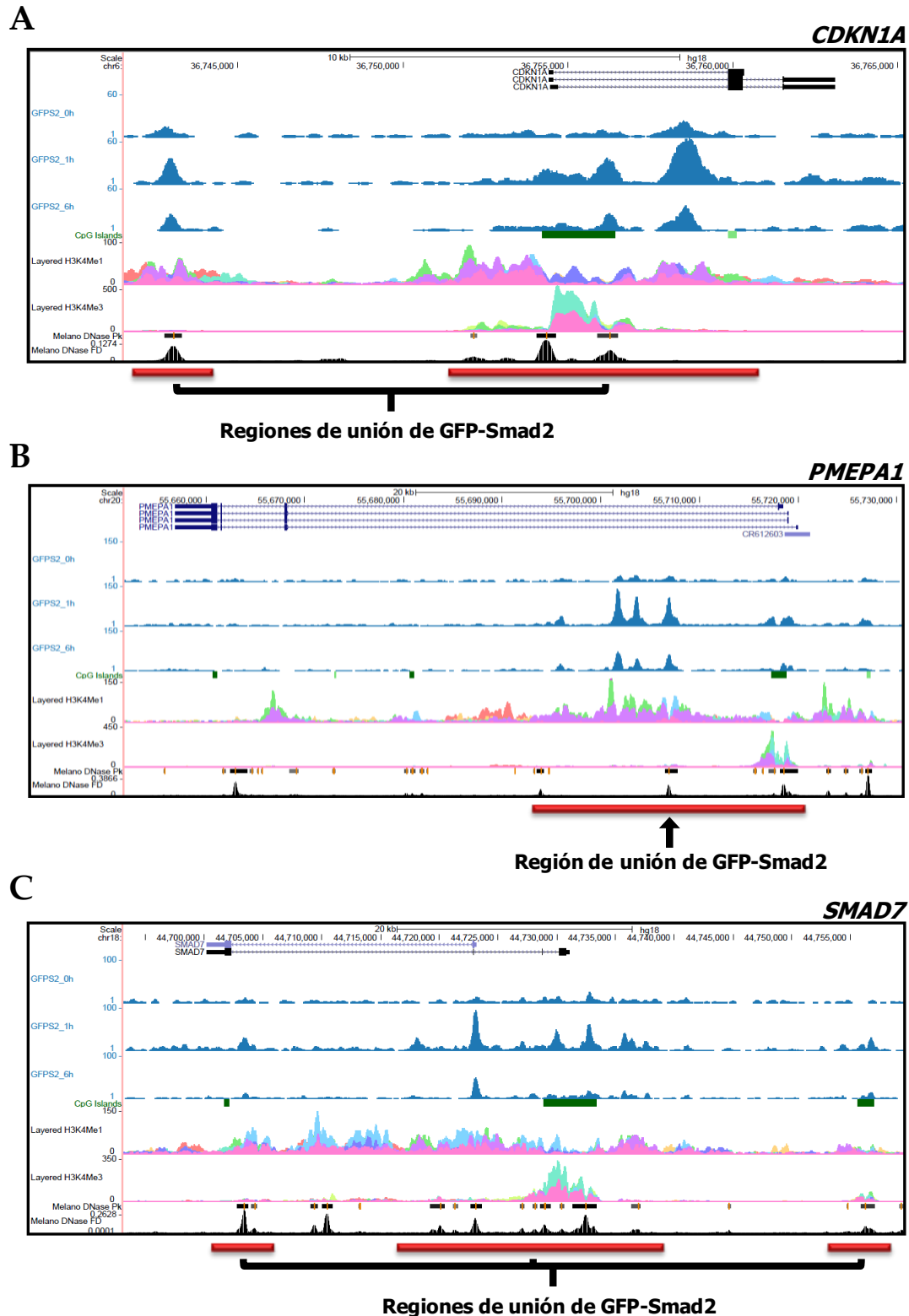


Figura 74. Histogramas de los perfiles de unión de GFP-Smad2 a los genes *CDKN1A*, *PMEPA1* y *SMAD7*. Para todos los genes analizados se detallan los perfiles de unión a 0, 1 y 6 horas de estimulación con 2 ng/ml de TGFβ de las células HaCaT-GFP-Smad2. A. Perfil de unión de GFP-Smad2 al DNA que contiene el gen *CDKN1A*. B. Perfil de unión de GFP-Smad2 al DNA que contiene el gen *PMEPA1*. C. Perfil de unión de GFP-Smad2 al DNA que contiene el gen *SMAD7*. Para detalles de la figura, ver pie de figura 66.

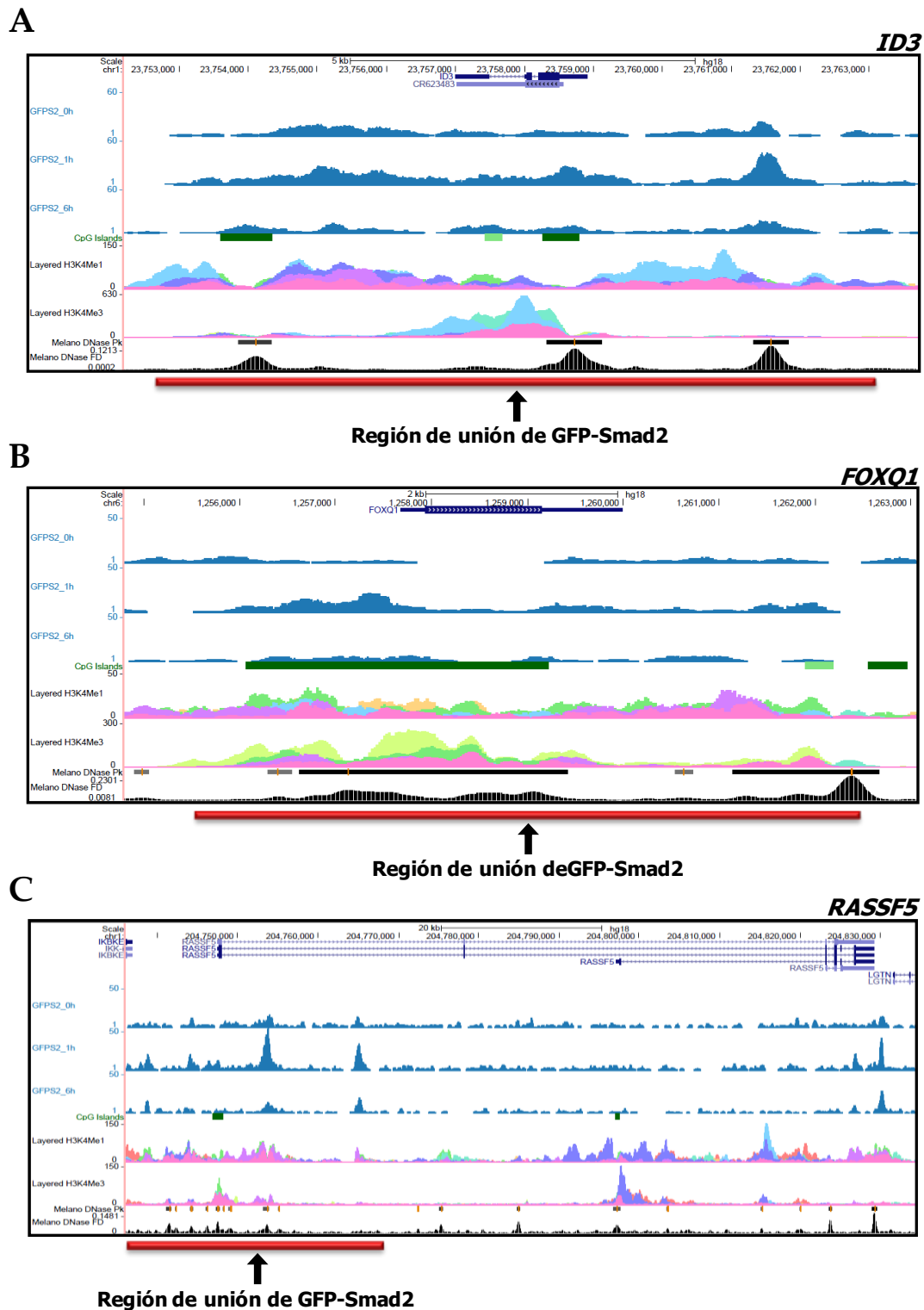


Figura 75. Histogramas de los perfiles de unión de GFP-Smad2 a los genes *ID3*, *FOXQ1* y *RASSF5*. Para todos los genes analizados se detallan los perfiles de unión de GFP-Smad2 a 0, 1 y 6 horas de estimulación con 2 ng/ml de TGF β de las células HaCaT-GFP-Smad2. A. Perfil de unión de GFP-Smad2 al DNA que contiene el gen *ID3*. B. Perfil de unión de GFP-Smad2 al DNA que contiene el gen *FOXQ1*. C. Perfil de unión de GFP-Smad2 al DNA que contiene el gen *RASSF5*. Para detalles de la figura, ver pie de figura 66.

III.12.4 Validación por qPCR de los genes seleccionados en el análisis del RNA-Seq.

Validamos los resultados obtenidos del RNA-Seq por qPCR. Para ello, utilizamos los genes seleccionados en el análisis del RNA-Seq cuyo $\log_2(\text{NE}_{\text{InhibidorTx}}/\text{NE}_{\text{DMSOTx}})$ es mayor que +0,7 a 1 ó 6 horas con TGF β , genes cuya expresión es regulada negativamente por TGF β y la inhibición de Sirt1 antagoniza el efecto de TGF β (ver figuras 68, 69). Validamos por qPCR estos dos grupos debido al interés de este trabajo que es el estudio de los genes cuya expresión es regulada negativamente por TGF β y analizar si Sirt1 media dicha inhibición (ver figura 61). La validación se realizó con los genes *CCDC34*, *CITED4*, *HOXC9*, *TMEM238* y *SNRNP35* (grupo 1, tabla 40) y *CFL2*, *HUS1*, *INSIG2*, *MKL2* y *TMEM41A* (grupo 2, tabla 40). Estos genes presentan una mayor ocupación de GFP-Smad2 en sus promotores con el tratamiento de TGF β (ver figura 67 A, B) lo que los convierte en buenos candidatos para la validación de los resultados del RNA-Seq. Además, los inhibidores de Sirt1 afectan notoriamente a la expresión dependiente de TGF β de dichos genes (Figura 68, 69).

Células HaCaT fueron tratadas con 1 μM de EX527, 1 μM de HR73 o DMSO (control) durante 2 horas. Seguidamente, las células fueron estimuladas con 2 ng/ml de TGF β durante 1, 2 y 6 horas. Se extrajo el RNA de cada una de las muestras y se analizó mediante qPCR la expresión de los diferentes genes seleccionados. Los datos de qPCR muestran que la regulación negativa de la transcripción dependiente de TGF β de estos 10 genes es principalmente antagonizada por la adición del inhibidor EX527 (Figura 76, 77). En 7 de los 10 genes analizados la adición del inhibidor de Sirt1, HR73, tiene también cierto efecto: *CITED4*, *HOXC9*, *SNRNP35*, *CFL2*, *HUS1*, *INSIG2* y *TMEM41A* (Figura 76, 77). En el caso del inhibidor EX527, el efecto antagonista de la inhibición de Sirt1 llega a producir la inducción de la expresión de esos 10 genes. Los datos de RNA-Seq muestran a ambos inhibidores con un efecto antagonista similar (ver figura 68, 69), sin embargo, los datos de qPCR indican que, aunque con la misma tendencia antagonista, EX527 tiene un mayor efecto sobre la transcripción dependiente de TGF β de dichos genes. De esta manera, pudo ser validado el efecto antagónico de la

inhibición de Sirt1 sobre genes cuya transcripción es regulada negativamente por TGF β .

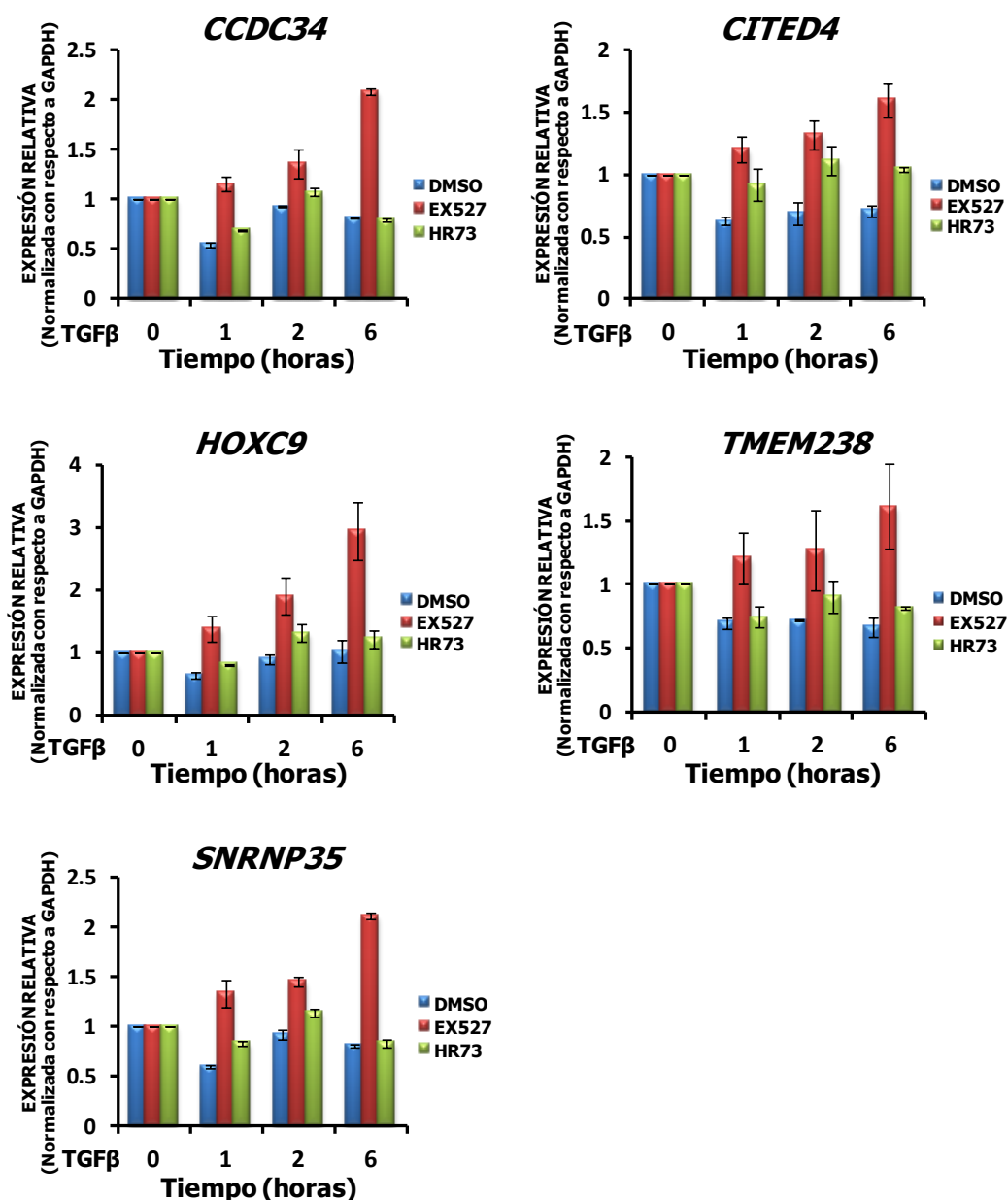


Figura 76. Efecto de los inhibidores EX527 y HR73 sobre la expresión de genes que son regulados negativamente por TGF β ($\log_2(N_{EInhibidorTx}/N_{EDMSOTx})$ es mayor a +0,7 a 1 hora con TGF β : grupo 1, tabla 40). Datos qPCR. Células HaCaT fueron tratadas con 1 μ M de EX527, 1 μ M de HR73 o con DMSO como control durante 2 horas y seguidamente fueron estimuladas con 2 ng/ml de TGF β durante 1, 2 y 6 horas. Se extrajo el RNA y se analizó mediante qPCR la expresión de los genes *CCDC34*, *CITED4*, *HOXC9*, *TMEM238* y *SNRNP35*. Se analizaron los datos de tres experimentos distintos. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. La expresión está normalizada con respecto a la expresión de GAPDH y respecto a una muestra 0 horas con TGF β .

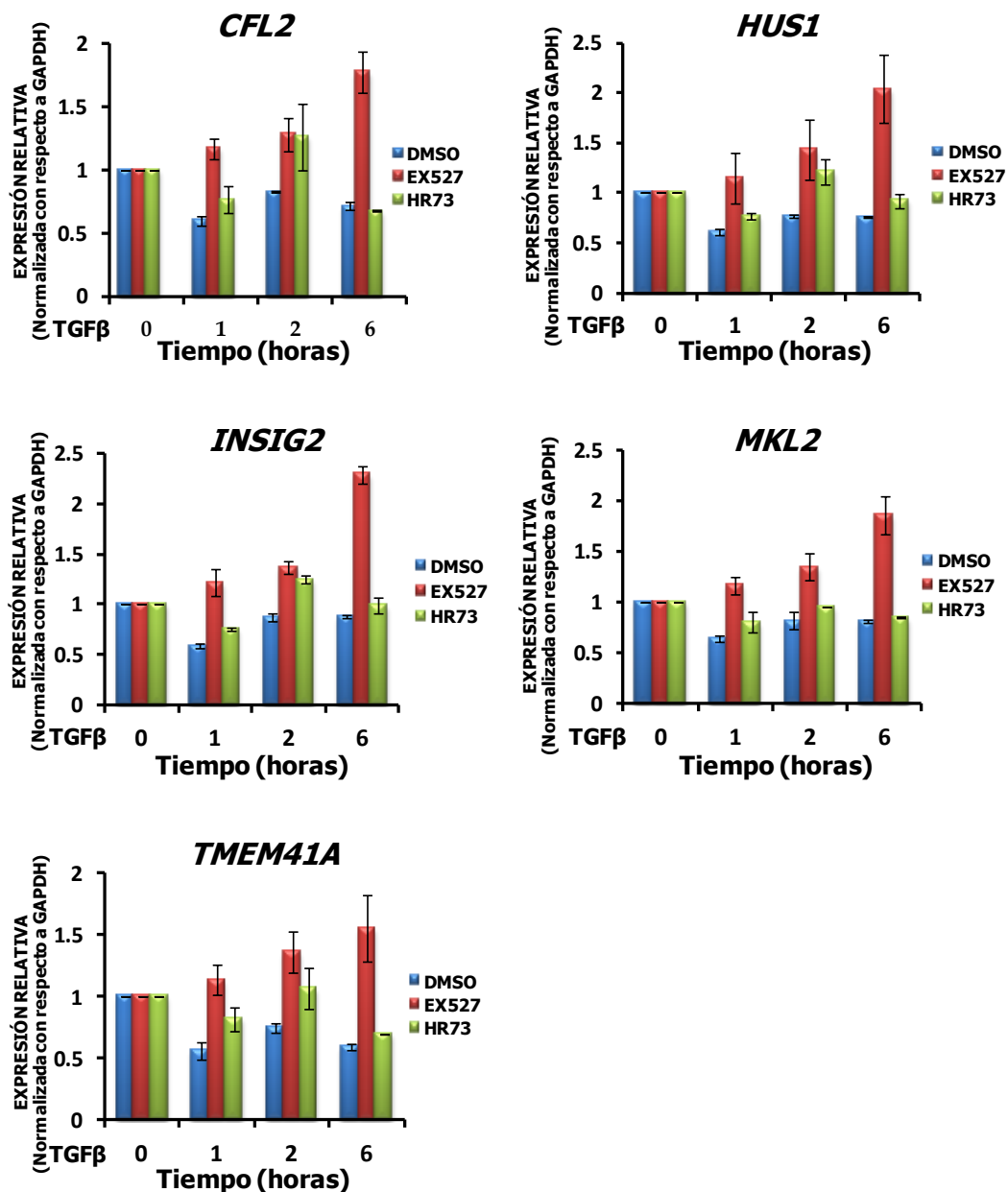


Figura 77. Efecto de los inhibidores EX527 y HR73 sobre la expresión de genes que son regulados negativamente por TGFβ ($\log_2(NE_{\text{InhibidorTx}}/NE_{\text{DMSOTx}})$) es mayor a +0,7 a 6 horas con TGFβ: grupo 2, tabla 40). Datos qPCR. Células HaCaT fueron tratadas con 1 μM de EX527, 1 μM de HR73 o con DMSO como control durante 2 horas y seguidamente fueron estimuladas con 2 ng/ml de TGFβ durante 1, 2 y 6 horas. Se extrajo el RNA y se analizó mediante qPCR la expresión de los genes *CFL2*, *HUS1*, *INSIG2*, *MKL2* y *TMEM41A*. Se analizaron los datos de tres experimentos distintos. Las barras de error representan la desviación estándar de los datos. La expresión está normalizada con respecto a la expresión de GAPDH y respecto a una muestra 0 horas con TGFβ.

IV. DISCUSIÓN

IV.1. Búsqueda de nuevas moléculas que interaccionan con Smad2.

TGF β es una citoquina que regula numerosas respuestas celulares involucradas en la proliferación y diferenciación celular, el desarrollo embrionario, la cicatrización de heridas, la angiogénesis y la apoptosis (2, 4). La aparente simpleza de la ruta de TGF β , lineal y no amplificada, no justifica adecuadamente la variabilidad de respuestas biológicas que distintos tipos celulares son capaces de generar al ser estimuladas con TGF β (134). Esto puede ser explicado en parte, por la compleja regulación de la respuesta a TGF β que es específica del tipo celular, estado fisiológico de la célula, la concentración del ligando y duración del estímulo (5). Además, podemos especular que proteínas accesorias que interaccionen con las Smads pueden, en parte, ser responsables de la variedad de fenómenos biológicos desencadenados por la estimulación con TGF β .

El objetivo de este trabajo ha sido la búsqueda, identificación y caracterización de nuevas proteínas que interaccionan con Smad2, uno de los principales mediadores de la cascada de señalización de TGF β . Para ello, hemos utilizado el Sistema Doble Híbrido Cyto Trap[®], una herramienta que permite estudiar interacciones de proteínas con función activadora o represora transcripcional como es el caso de Smad2. Esta herramienta ha sido utilizada con éxito por otros grupos de investigación, pudiendo determinar interacciones novedades entre proteínas y posteriormente validarlas en sistemas *in vivo* (140-143). Varios autores han estudiado nuevas interacciones con el dominio MH2 de Smad3 usando el Sistema Doble Híbrido tradicional (219), mientras que otros autores han determinado proteínas que interaccionan con Smad2 y Smad3 mediante purificación, digestión y análisis de cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (220). La aproximación del Sistema Doble Híbrido Cyto Trap[®] para la búsqueda de proteínas que interaccionan con Smad2 es considerablemente más efectiva que los métodos mencionados anteriormente. Esta técnica es capaz de detectar un mayor número de proteínas interactoras que otras aproximaciones de tipo bioquímico (135). Se pueden detectar proteínas que interaccionan de manera transitoria o débil; o que están poco expresadas. Tras la búsqueda, identificación y caracterización

de nuevas moléculas que interactúan con Smad2, utilizando el Sistema Doble Híbrido Cyto Trap[®], hemos encontrado 110 proteínas. Dentro de este grupo, se encuentran proteínas cuya interacción con Smad2 ya había sido descrita previamente así como proteínas de interacción no descrita. Entre todas estas proteínas seleccionamos a Sirt1 para realizar un estudio más profundo de su implicación en la ruta de señalización de TGF β , en concreto, nos centramos en aspectos relacionados con Smad2.

Para realizar la búsqueda de nuevas proteínas que interactúan con Smad2, se utilizó una librería de expresión obtenida de un tejido humano mayoritariamente epitelial, en concreto una librería de expresión de epitelio pulmonar de adulto (pMyr-Librería(PH)). Smad2 no pudo ser utilizada como cebo en el Sistema Doble Híbrido Cyto Trap[®]: al ser ensayada con Smad4 (pMyr), no cumplía los criterios de selección de la Prueba de Interacción. Por tanto, se ensayaron diferentes construcciones de Smad2 para determinar cuáles de ellas, conservando la mayor parte de la longitud de Smad2, cumplían los criterios de selección para una interacción válida con Smad4 (pMyr). Finalmente, tras una selección cuidadosa, decidimos utilizar como proteína cebo una construcción de Smad2 que carece de 93 aminoácidos del extremo N-terminal, el clon Smad2 94-468 (1/2MH1-L-MH2), al que denominamos en este trabajo Smad2 Δ 93. Dicho clon era capaz de interactuar con Smad4 y no producía, por sí mismo, estimulación de la proliferación de la levadura, por lo tanto era el candidato más idóneo. De la búsqueda de proteínas que interactúan con Smad2 Δ 93, utilizando el Sistema Doble Híbrido Cyto Trap[®], se seleccionaron 300 Presuntos Clones Positivos, clones cuya proliferación bajo condiciones restrictivas en la Prueba de Interacción se produjo sólo en medio con galactosa.

La verificación de la interacción entre proteínas es un paso muy importante en la selección de los clones cuyo crecimiento se deba única y exclusivamente a la interacción de la proteína fusionada a Myr con Smad2 Δ 93. Dentro de los Presuntos Clones Positivos seleccionados en un primer momento, había que descartar los clones que, por la propia proteína fusionada a Myr o por la interacción directa entre la proteína fusionada a Myr con la proteína hSos, induzcan directamente Ras y por tanto

activen la proliferación de la levadura. Tras esta verificación de la interacción, fueron seleccionados 195 Clones Positivos Confirmados. Tras la secuenciación, alineación por homología e identificación de los mismos, este número se redujo a un conjunto de 110 proteínas que interactúan con Smad2 Δ 93 en el Sistema Doble Híbrido Cyto Trap®. De todas las proteínas seleccionadas por su interacción con Smad2 Δ 93, el 79% son nuevas proteínas interactoras, cuya interacción no había sido descrita con Smad2, ni presentaban ninguna relación previa con la señalización de TGF β . En el porcentaje restante, se encontraron proteínas descritas previamente por su interacción con Smad2. Tal es el caso de MAN1 (39, 173) y CKIe (171), lo que valida el método utilizado para la detección de nuevas proteínas que interactúan con Smad2. Además, también se encontraron proteínas que aunque no está descrita su interacción con Smad2, están previamente relacionadas con la señalización de TGF β : proteínas que interactúan con otras Smads, proteínas cuya expresión se modifica con la señalización de TGF β , proteínas susceptibles de ser fosforiladas tras la estimulación de dicha citoquina etc. Tal es el caso de RNF11 (184), ICAM1 (183) y HEF1 (177).

Nuestra lista de clones fue sometida a un análisis de agrupamiento funcional que permite entender el significado biológico de un gran conjunto de genes, clasificándolos bajo un mismo significado o función biológica. El agrupamiento funcional realizado de las 110 proteínas que interactúan con Smad2 Δ 93 con la herramienta web DAVID, reveló una tendencia de Smad2 Δ 93 a estar implicado con determinados grupos de proteínas funcionalmente relacionadas: fosfoproteínas, proteínas implicadas en acetilación, proteínas que participan en la respuesta al estrés, proteínas implicadas en el procesamiento y splicing de mRNA, etc. Sin embargo, el análisis de DAVID está sesgado debido a que la selección de proteínas proviene de una búsqueda con el Sistema Doble Híbrido Cyto Trap® en *S. cerevisiae*, un organismo donde la fosforilación y la acetilación de Smad2, entre otros, no se producen. Por tanto, con este método no podemos encontrar todas las posibles interacciones proteicas con Smad2 sino sólo un subconjunto de ellas. Este hecho puede explicar que en el conjunto de proteínas que interactúan con Smad2 Δ 93 en *S. cerevisiae* no encontremos Smad4, la principal proteína que une Smad2 tras su fosforilación por la estimulación con TGF β . A pesar de esta limitación, este análisis nos muestra en qué grupos funcionales se

encuentran las proteínas obtenidas que interactúan con Smad2Δ93. En el caso de Sirt1, por ejemplo, esta proteína se encuentra en los grupos de función de fosfoproteínas, acetilación, interacción virus-huésped y proteínas nucleares, cuatro grupos funcionales con un valor pEASE reducido. Esto nos da confianza de que Sirt1 sea un candidato interesante para estudiar su implicación en la ruta de señalización de TGFβ a través de Smad2.

IV.2. Elección de la proteína Sirt1. Estudio de su relación con la señalización de TGFβ.

Dentro del conjunto de los clones detectados como proteínas que interactúan con Smad2Δ93 en el Sistema Doble Híbrido Cyto Trap®, encontramos la proteína Sirt1, una desacetilasa de histonas de clase III dependiente de NAD⁺ (78, 79). Sirt1 está implicada en la desacetilación de las histonas H1, H3 y H4 (102) y de otras proteínas no histónicas como factores de transcripción como p53, FOXOs, E2F1 y la subunidad RelA/p65 de NF-κB, factores implicados en reparación del DNA como Ku70, y coactivadores de la transcripción como CBP/p300, entre otros (100). En respuesta a TGFβ, Smad2 es fosforilada en su extremo carboxilo terminal y además es acetilada por CBP/p300 y PCAF (54, 55). La acetilación de Smad2 promueve su acumulación nuclear en respuesta a TGFβ, decreciendo su exportación nuclear, lo que lleva a un aumento en la transcripción dependiente de TGFβ (55). La acetilación de Smad2 incrementa la complejidad de la regulación en la actividad transcripcional de Smad2 (54, 55). Smad3, al igual que Smad2, también es acetilada por TGFβ, lo que estimula la transcripción dependiente de TGFβ asociada a Smad3 (57). Recientemente, Sirt1 ha sido descrita como una desacetilasa para Smad3, inhibiendo su actividad transcripcional (58). Smad7 es acetilada por p300 lo que previene su ubiquitinación y degradación. TGFβ induce la desacetilación de Smad7, favoreciendo su ubiquitinación y su consecuente degradación vía proteosoma (48). Entre las desacetilasas implicadas en la desacetilación de Smad7 se encuentra Sirt1, sin embargo, no se conoce el mecanismo concreto por el cual TGFβ regula Sirt1 para estimular la desacetilación de Smad7 (50). La interacción de Sirt1 con Smad2 en el Sistema Doble Híbrido Cyto Trap®,

sugería la posibilidad de que Sirt1 estuviera involucrada en la desacetilación de Smad2 y, de esta manera, podría entenderse como un nuevo elemento regulador en la compleja vía de señalización de TGF β . Hasta este momento no se conoce la desacetilasa involucrada en la desacetilación de Smad2.

La alteración de la ruta de señalización de TGF β ha sido relacionada con enfermedades tales como arterioesclerosis, fibrosis, enfermedades autoinmunes y cáncer. También Sirt1, debido a la diversidad de funciones que desempeña, está implicada en una gran variedad de enfermedades humanas como síndromes metabólicos, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares y enfermedades relacionadas con el sistema inmune e inflamación (86, 89, 90, 99). Sirt1 también está involucrada en cáncer (89, 90, 100). El papel de TGF β en cáncer es muy complejo: inicialmente actúa como supresor tumoral, pero en estadios avanzados de la progresión tumoral TGF β promueve la tumorogénesis (4, 6, 8). Por su parte, el papel de Sirt1 en tumorogénesis también es complejo ya que ha sido asociado tanto a una función pro-oncogénica como a una función supresora tumoral. Estos datos son ilustrativos de una función de Sirt1 en tumorogénesis que depende del contexto y tipo celular (89, 90, 100). Además, se ha descrito que Sirt1, al igual que la señalización de TGF β , induce EMT (132). Por lo tanto, Sirt1 y la señalización de TGF β son dianas terapéuticas posibles para distintas enfermedades, entre las que se encuentra el cáncer. Un desequilibrio en la acetilación de Smad2 y la consecuente inhibición de la transcripción dependiente de Smad2 (TGF β), podría ser la causa de alguna de estas enfermedades. Por consiguiente, el estudio de la interacción entre Smad2 y Sirt1, y por tanto la influencia de Sirt1 en la señalización de TGF β , quizá ayude a entender mejor la compleja regulación de la señalización de TGF β y dar un paso más en la búsqueda de mecanismos de control de diversas enfermedades, entre las que se encuentra el cáncer.

IV.3. Smad2 y Sirt1 interaccionan *in vivo* e *in vitro*. Su interacción se ve potenciada por TGF β .

En nuestro laboratorio determinamos que la interacción de Sirt1 con Smad2, encontrada en el Sistema Doble Híbrido Cyto Trap[®], podría ser observada *in vivo* en

células eucarióticas HEK293T y Hep3B. Esta interacción se ve incrementada por la estimulación con TGF β . Además, la unión entre Smad2 y Sirt1 alcanza un máximo a las dos horas de tratamiento con TGF β (datos no mostrados). Los análisis de His-Pulldown realizados revelan que estas dos proteínas, en ausencia de otras proteínas, interaccionan *in vitro*, lo que nos permite concluir que la interacción se produce de manera directa y sin la intervención de proteínas accesorias.

La acetilación de Smad2 que es dependiente de p300 y TGF β , aumenta notablemente en presencia de TSA, un inhibidor de desacetilasas de tipo I y II, lo que sugiere que la acetilación de Smad2 es un proceso dinámico (54, 55) donde desacetilasas de tipo I y II estarían contribuyendo a su desacetilación. El tratamiento de las células HEK293T con TSA permite la detección de la acetilación de Smad2 en respuesta a TGF β sin recurrir a la sobreexpresión de p300, posiblemente debido a la limitada actividad endógena de p300/CBP en dichas células (57). La acetilación de Smad2 en respuesta a TGF β no es detectada sin el tratamiento con TSA (54, 55). En nuestros experimentos, hemos mostrado que el tratamiento con TSA potencia notablemente la interacción de Smad2 con Sirt1 lo que sugiere que la interacción entre Sirt1 y Smad2 puede estar beneficiada por la acetilación de Smad2 que potencia el tratamiento con TSA.

Al igual que otras líneas de carcinomas hepatocelulares, las células Hep3B expresan altos niveles de Sirt1 (131). En esta línea celular se ha estudiado además la acetilación de Smad2 dependiente de TGF β (55). Para la detección de la interacción entre Sirt1 y Smad2, las células Hep3B siempre fueron tratadas previamente con TSA en condiciones de baja concentración de Suero Bovino Fetal (55) lo que incrementa la acetilación de Smad2. Hemos mostrado que en la mencionada línea celular se detecta una interacción entre Sirt1 y Smad2 que es potenciada por TGF β . El incremento en la interacción de estas dos proteínas por TGF β es más patente en Hep3B que en células HEK293T, lo que puede ser debido a que en Hep3B, Smad2 es acetilada por TGF β más eficientemente que en HEK293T (55). Por lo tanto, trabajar con Hep3B elimina la necesidad de sobreexpresar p300. Podemos pensar, por tanto, que un mayor grado de acetilación de Smad2 en Hep3B beneficie su interacción con Sirt1. Esto concuerda con

los resultados obtenidos en HEK293T donde el tratamiento con TSA potencia la interacción de ambas proteínas. Otras proteínas, como por ejemplo p53, incrementan su unión con Sirt1 cuando están activas y acetiladas (193). Además, en Hep3B también hemos detectado endógenamente la interacción de las proteínas Smad2 y Sirt1. Dicha interacción también se incrementa con la estimulación con TGF β . La dependencia de TGF β en la interacción de Smad2 y Sirt1 concuerda con los datos de interacción de proteínas sobreexpresadas en células HEK293T y Hep3B. En células HEK293T, la interacción endógena entre Smad2 y Sirt1 no fue detectada, sugiriendo que la acetilación más efectiva de Smad2 en células Hep3B mejora la interacción entre ambas proteínas.

La interacción de Smad2 y Sirt1 pudo por tanto ser confirmada con el uso de proteína sobreexpresada y con proteína endógena. Las interacciones entre las desacetilasas y sus sustratos suelen ser transitorias. El hecho de encontrar una interacción entre Smad2 y Sirt1 endógenas sin recurrir a la sobreexpresión, da mayor relevancia a la interacción encontrada entre ellas y sugiere que Smad2 puede ser sustrato de Sirt1. Por otro lado, podemos pensar que ambas proteínas interactúan para desempeñar una función no necesariamente relacionada con la desacetilación de Smad2.

IV.4. Sirt1 no afecta al estado acetilado de Smad2.

Como hemos comentado previamente, Sirt1 es una desacetilasa de histonas y proteínas no histónicas (90). Por otro lado, en respuesta a TGF β , Smad2 es acetilada por CBP/p300 y PCAF, lo que incrementa su actividad transcripcional (54, 55). Esta acetilación se hace más evidente con el tratamiento con TSA de las células (54, 55), lo que sugiere que la acetilación de Smad2 es un proceso dinámico donde están implicadas desacetilasas de tipo I y II. Este hecho, sin embargo, no excluye que Smad2 también pudiera ser desacetilada por desacetilasas tipo III como Sirt1. Smad7, cuya acetilación aumenta con el tratamiento de las células con TSA, es desacetilada tanto por HDAC1, 3 y 6 (49) como por Sirt1 (50). Además, por otro lado, la acetilación de p53 también está mediada por un complejo que contiene HDAC1 (221) y por Sirt1 (105,

106). Hasta ahora no se ha encontrado la proteína responsable de la desacetilación de Smad2. La interacción descrita para Sirt1 y Smad2 sugiere la posibilidad de que Sirt1 pudiera estar desacetilando a Smad2. En el caso de sustratos conocidos de Sirt1 como p53, la sobreexpresión de Sirt1WT provoca un descenso en la cantidad de p53 acetilada, mientras que la sobreexpresión de Sirt1H363Y no disminuye la acetilación de p53 sino que la incrementa ligeramente pues actúa como un dominante negativo (105, 106). Nuestros experimentos indican que Sirt1 no desacetila a Smad2. El estado de acetilación de Smad2 no varía por la sobreexpresión de Sirt1WT ni tampoco por la sobreexpresión del mutante Sirt1H363Y. La proteína Sirt1 expresada exógenamente es catalíticamente activa puesto que en los ensayos de luciferasa realizados en este trabajo, la sobreexpresión de Sirt1 es capaz de inhibir la actividad transcripcional de dos genes reporteros que, sin embargo, no se ve afectada por la sobreexpresión del mutante Sirt1H363Y. Los datos obtenidos de sobreexpresión de Sirt1 exógena indican que Sirt1 no influye en el estado de acetilación de Smad2 y sugieren, por tanto, que Sirt1 no está implicada en la desacetilación de Smad2. Entre las proteínas obtenidas en el Sistema Doble Híbrido Cyto Trap[®] que interaccionan con Smad2Δ93, encontramos la histona desacetilasa 6 (HDAC6). Esta proteína es un buen candidato a ser la responsable de la desacetilación de Smad2 y ofrece una vía de investigación muy interesante para abordar en el futuro. Por tanto, concluimos que la interacción de Sirt1 con Smad2 no produce cambios en el estado de acetilación de esta última lo que sugiere que estas dos proteínas, si interaccionan, lo hacen para desempeñar una función distinta a la desacetilación de Smad2.

IV.5. La interacción de Sirt1 con Smad2 es potenciada por la acetilación de Smad2 y la actividad desacetilasa de Sirt1.

Nuestros resultados sugieren que Sirt1 no desacetila Smad2, sin embargo, hemos mostrado que la acetilación de Smad2 y su interacción con Sirt1 son potenciadas por la estimulación con TGFβ. En respuesta a TGFβ, los principales residuos de Smad2 acetilados por p300 son los residuos de lisina 19, 20 y 39 (55). En nuestro laboratorio hemos determinado que, aunque Smad2 no sea sustrato de desacetilación para Sirt1, la

interacción entre ambas proteínas se ve potenciada por la acetilación de Smad2. Mostramos que el cambio de los tres residuos de lisina 19, 20 y 39 por glutamina en Smad2, que es funcionalmente similar a la acetilación de la proteína, potencia la interacción entre Smad2 y Sirt1 en HEK293T. La interacción de Sirt1 con Flag-Smad2WT en células inducidas con TGF β es menor a la detectada con el mutante Flag-Smad2K19,20,39Q en células no inducidas. Esto puede ser debido a que la acetilación de Smad2 es menor en células HEK293T en ausencia de p300 sobreexpresado. Por tanto, el mutante Flag-Smad2K19,20,39Q representa una situación de acetilación ideal que no se produce en células HEK293T en respuesta a TGF β debido a los bajos niveles de expresión de p300. Además, no encontramos diferencias sustanciales en el grado de unión entre Sirt1/Smad2WT y el grado de unión entre Sirt1/Flag-Smad2K19,20,39R. La explicación podría ser que, en células HEK293T, la débil acetilación de Smad2, en respuesta a TGF β , no genere diferencias de unión entre Smad2 y el mutante no acetilable con la proteína Sirt1. Los resultados de este experimento, junto con el hecho de que la interacción entre Smad2 y Sirt1 se ve potenciada por la presencia de TSA, y que la interacción de Sirt1 con Smad2 y la acetilación de Smad2 se incrementan con el tratamiento de TGF β , nos llevan a concluir que la interacción entre Sirt1 y Smad2 se potencia por la acetilación de Smad2.

Sirt1 requiere de su actividad desacetilasa para interaccionar con algunos de sus sustratos. Sirt1 interacciona con p300 inhibiendo su transactivación. La unión de p300 a Sirt1H363Y, mutante de Sirt1 carente de actividad desacetilasa, es menor que con la proteína silvestre, indicando que la actividad desacetilasa de Sirt1 es importante para la interacción con p300 (125). Hemos determinado que acetyl-Smad2 no es un sustrato de la actividad desacetilasa de Sirt1, sin embargo, nuestros experimentos indican que la actividad desacetilasa de Sirt1 es importante para su interacción con Smad2, pues la interacción de Smad2 y Sirt1 se ve notablemente disminuida cuando Sirt1 presenta una mutación específica que impide su actividad catalítica. Además, la interacción de Smad2 con el mutante Sirt1H363Y no es incrementada con la estimulación de las células con TGF β . Por lo tanto, podemos concluir que la actividad catalítica de Sirt1 es importante para su interacción con Smad2 en estado de reposo y durante la estimulación con TGF β .

IV.6. En extractos proteicos totales, Sirt1 no se une a la forma fosforilada de Smad2 ni forma un complejo trimérico con Smad4/Smad2 fosforilada.

La fosforilación de Smad2 y Smad3 por los receptores tipo I de TGF β es esencial para la formación de complejos heterotriméricos con Smad4, que se translocan al núcleo y activan una gran variedad de genes (5, 19). TGF β induce la fosforilación de Smad2 específicamente en los residuos de serina 465 y 467 en el extremo carboxilo de la proteína (41, 42). La fosforilación de Smad2 es necesaria para su translocación al núcleo donde Smad2 es acetilada posteriormente por p300 (55, 57). Aunque el incremento de Smad2 nuclear ha sido sugerido como el mecanismo de TGF β para regular la acetilación de Smad2, la acetilación de esta proteína en el núcleo ocurre independientemente de su estado de fosforilación (55). Nuestros datos sugieren que, en extractos proteicos totales, Sirt1 se une preferentemente a la forma no fosforilada de Smad2. La interacción de Sirt1 con el mutante Smad2AAMA es mayor que la interacción detectada con Smad2WT. Este dato es coherente con el hecho de que Sirt1 se una con mayor afinidad a Smad2 no fosforilada. Además, la interacción de este mutante con Sirt1 no varía con la estimulación por TGF β . Algunos trabajos han sugerido que dicho mutante no precisa de estimulación con TGF β para translocarse al núcleo (55). Por tanto, Smad2AAMA, al localizarse en el núcleo sin necesidad de ser estimulado por TGF β , sería acetilado por p300. Como vimos anteriormente, la acetilación de Smad2 potencia su interacción con Sirt1. Por todo lo anterior, el mutante Smad2AAMA no dependería de la estimulación de TGF β para potenciar su interacción con Sirt1.

Hemos realizado experimentos adicionales que aportan evidencias de que Sirt1, en extractos proteicos, se une preferentemente a la forma no fosforilada de Smad2. En células estimuladas con TGF β , la inmunoprecipitación de Sirt1 revela la unión a Smad2, aunque la forma de Smad2 co-inmunoprecipitada no presenta fosforilación. El contenido total de proteínas en la muestra estimulada con TGF β , sin embargo, muestra una clara fosforilación de Smad2. Además, aunque unida a Smad2, Sirt1 no forma un complejo con Smad4 en células estimuladas con TGF β . La inmunoprecipitación

independiente de Smad2 o Smad4 muestra que Smad2 se une tanto a Smad4 como a Sirt1 de manera TGF β dependiente. Sin embargo, Smad4, en condiciones de estimulación con TGF β , sólo se une a Smad2, y no se detecta ninguna unión con Sirt1. Dado que Smad4 sólo se une a la forma fosforilada de Smad2 (19), todos estos datos indican que Sirt1, en extractos proteicos totales, no forma parte del complejo activado de Smad2 fosforilada/Smad4.

Por último, el tratamiento de extractos proteicos de células Hep3B con la proteína fosfatasa λ potencia la interacción de Smad2 con Sirt1. En células que fueron sometidas a condiciones para favorecer la acetilación de Smad2 (55), la disminución de los niveles de fosforilación de Smad2 al 50% con fosfatasa λ fue suficiente para incrementar la interacción entre Sirt1 y Smad2, confirmando que Sirt1, en extractos proteicos totales, se une preferentemente a Smad2 no fosforilada.

Todos los resultados obtenidos con los experimentos de los mutantes de acetilación de Smad2, junto con los obtenidos con el mutante de fosforilación de Smad2, más las diferentes co-inmunoprecipitaciones de Smad2, Smad4 y Sirt1, y los resultados obtenidos del tratamiento de las células con fosfatasa λ , indican que Sirt1, en extractos proteicos totales, se une preferentemente a la forma no fosforilada aunque acetilada de Smad2.

El hecho de que Sirt1 tenga preferencia por la unión, en extractos proteicos totales, a Smad2 no fosforilada y no forme un complejo con Smad4, nos llevó a pensar en la posibilidad de que la interacción de Sirt1 con Smad2 pudiera competir con la formación del complejo Smad2/Smad4 durante la estimulación con TGF β . Sin embargo, resultados de nuestro laboratorio muestran que la activación de Sirt1 por resveratrol no modifica significativamente la cantidad de Smad4 unida a Smad2 tras la estimulación con TGF β , ni en el estado de fosforilación de Smad2. Tampoco la activación de Sirt1 por resveratrol determina una terminación prematura de la interacción Smad2/Smad4 o la terminación prematura de la fosforilación de Smad2. Experimentos en los que sobreexpresamos Sirt1 tampoco muestran variación en la cantidad de Smad4 unida a Smad2 tras la estimulación con TGF β , ni el estado de fosforilación de Smad2 así como no producía una terminación prematura de la unión de Smad4 a Smad2 ni la

fosforilación de Smad2 (datos no mostrados). Estos datos sugieren que la mayor activación de Sirt1 o su sobreexpresión no interfieren en la formación de un complejo Smad2/Smad4 formado durante la estimulación con TGF β . Sin embargo, no podemos descartar que una unión de Sirt1 más activa o un aumento de la concentración de Sirt1 tengan consecuencias en la función que Sirt1 pueda realizar junto con Smad2. Además, el hecho de que no detectemos, en extractos proteicos totales, la unión de Sirt1 con Smad4 ni Smad2 fosforilada puede deberse a que Smad4 compita la unión de Smad2 fosforilada con Sirt1. Ésta es una vía de investigación muy interesante que se quiere abordar en nuestro laboratorio en el futuro.

La fosforilación de Smad2 es requerida para su activación transcripcional (53). Smad2 no fosforilada tiene capacidad de unirse al DNA, pero no presenta actividad transcripcional *in vitro* sobre cromatina. De hecho, Smad2 no fosforilada disminuye ligeramente el nivel basal de la transcripción, lo que se ha interpretado como que Smad2 no fosforilada es reclutada al DNA interfiriendo con la transcripción basal (53). Notablemente, el dominio MH2 de Smad2 no fosforilado, en ausencia de los dominios MH1 y L, tiene actividad transcripcional sobre cromatina. Esto se explica por el hecho de que el dominio MH2 de Smad2 es inhibido por la interacción con MH1 cuando Smad2 no está fosforilada en su extremo carboxilo terminal (53). La fosforilación del extremo carboxilo despliega la estructura de Smad2 liberando el dominio MH2 y haciéndolo accesible a la interacción con otros factores (53). Adicionalmente, la acetilación de Smad2 es requerida para la actividad transcripcional dependiente de TGF β (55). Otros autores han demostrado en experimentos *in vitro*, que la acetilación en el residuo de lisina 19 de Smad2(Δ E3), una isoforma de Smad2 que retiene su capacidad de unirse al DNA, promueve su interacción con el DNA incluso en ausencia de la fosforilación mediada por receptor, aunque su relevancia fisiológica no ha sido dilucidada (54). En este trabajo hemos detectado una preferencia de unión de Sirt1, en extractos proteicos totales, con la forma no fosforilada aunque acetilada de Smad2. Sirt1 parece no interferir en la formación del complejo Smad2/Smad4. Por lo que el complejo formado por acetyl-Smad2 no fosforilada podría estar implicado en la regulación de la transcripción de genes diferentes a los regulados por el complejo Smad2 fosforilada/Smad4. Por otro lado, la tasa de exportación de Smad2 del núcleo al

citósol es más lenta que su tasa de desfosforilación y disociación de Smad4, por lo que Smad2, una vez desfosforilada y disociada de Smad4, permanece un tiempo en el núcleo (23). Quizá la unión de Sirt1 a Smad2, una vez desfosforilada ésta por las fosfatasas nucleares (24), sería capaz de impedir el replegamiento de Smad2 permitiendo que ésta permaneciera transcripcionalmente activa y así ejercer su acción sobre la transcripción de determinados genes. De hecho, detectamos la unión de Smad2 y Sirt1 en ausencia de la estimulación con TGF β , por lo que cabe la posibilidad de que, en estas circunstancias, Sirt1 y la pequeña cantidad de Smad2 no fosforilada presente en el núcleo, tenga un efecto sobre la transcripción de determinados genes. Experimentos adicionales son necesarios para saber si esta hipótesis es cierta y determinar la funcionalidad del complejo formado por Sirt1 y Smad2 no fosforilada.

IV.7. Sirt1 interacciona con Smad2 fosforilada *in vitro*.

Diversos experimentos de co-inmunoprecipitación utilizando extractos totales de proteína indican que Sirt1 no interacciona con la especie fosforilada de Smad2 ni forma un complejo con Smad4 en células estimuladas con TGF β . Sin embargo, experimentos *in vitro* muestran que Sirt1 interacciona con Smad2 de manera directa y que esta interacción se ve potenciada cuando Smad2 está fosforilada. Estos datos sugieren que Sirt1 es capaz de interactuar con Smad2 fosforilada y que dicha interacción es beneficiada por la fosforilación de Smad2. No hemos ensayado la presencia de Smad4 en este complejo o si este complejo es capaz de unir Smad4. En experimentos *in vitro*, la preferencia de Sirt1 por Smad2 fosforilada puede deberse a que Smad2, tras la estimulación con TGF β , sufra cambios conformacionales que dejen expuestos determinados dominios que interaccionen con Sirt1. De esta manera se facilitarían la interacción de Smad2 con Sirt1. La discrepancia de resultados entre los experimentos *in vivo* e *in vitro* puede deberse a las diferentes aproximaciones experimentales utilizadas, realizadas en contextos proteicos diferentes. En extractos proteico totales (*in vivo*) es posible que Smad4 u otras proteínas presentes interfieran la interacción entre Sirt1 y Smad2 fosforilada y, por tanto, sea difícil de detectar dicha interacción. Sin embargo, en los experimentos *in vitro*, en ausencia de Smad4 u otras proteínas, Sirt1 es capaz de interactuar con la especie de Smad2 fosforilada, siendo

dicha fosforilación beneficiosa para la interacción. Esto podría ser comprobado realizando el estudio de interacción entre Smad2 y Sirt1 en extractos proteicos de células que carezcan de Smad4, estimuladas o no con TGF β . Aunque hayamos mostrado que la interacción de Sirt1 y Smad2 se beneficia de la fosforilación de esta última, no podemos descartar que *in vivo* se formen complejos diversos, uno formado por Sirt1 y Smad2 no fosforilada y otro por Sirt1 y Smad2 fosforilada, y que cada uno de estos complejos tengan afinidades diferentes y actúen sobre la transcripción de genes diferentes (ver discusión apartado anterior).

IV.8. Dominios que intervienen en la interacción entre Smad2 y Sirt1.

Smad2 presenta tres dominios claramente definidos: MH1, L y MH2 (5, 8, 10). En una primera aproximación, intentamos determinar *in vivo* los dominios de Smad2 implicados en la interacción con Sirt1. Sin embargo, varios fragmentos proteicos de los clones que codificaban los distintos dominios de Smad2 no se expresaban adecuadamente o no podían ser inmunoprecipitados, lo que nos impidió obtener resultados concluyentes. Mediante la expresión de los diferentes dominios de Smad2 y Sirt1 en bacterias hemos determinado, *in vitro*, qué dominios de Smad2 están implicados en la interacción entre Smad2 y Sirt1. El estudio de los dominios mediante His-Pulldown revela que en dicha interacción participan el dominio MH1 y una zona incluida entre los aminoácidos 173 y 468 de Smad2 (dominios L y MH2). Los dominios que están implicados en la interacción entre Smad2 y el mutante catalíticamente inactivo Sirt1H363Y *in vitro* son los mismos que para Sirt1WT. A través del dominio MH1, las Smads también interaccionan con factores de transcripción entre los que se encuentran ATF2, Jun, Sp1 y TFE3. La interacción con dichos factores ayuda a estabilizar la unión de los complejos de las Smads al DNA (8). Además, el dominio MH1 es acetilado en respuesta a TGF β en sus residuos de lisina 19, 20 y 39 (55). Como ya hemos mostrado anteriormente en nuestros resultados, la acetilación de dichos residuos potencia la interacción de Smad2 con Sirt1. Smad7, al igual que Smad2, interacciona con Sirt1 a través de su extremo amino terminal, zona donde se

encuentran los residuos de lisina que son acetilados por p300 y que son objeto de la actividad desacetilasa de Sirt1 (50). Para identificar posibles dominios de unión de Sirt1 a Smad2 y Smad7, alineamos el dominio MH1 de Smad2 y el extremo amino terminal de Smad7 con NCBI Protein Blast (222) en busca de homologías de secuencia proteica. Hemos encontrado una zona comprendida entre los aminoácidos 47 y 170 de Smad2, y los aminoácidos 98 y 201 de Smad7 con un alto grado de homología (Figura 78 A). En ambas proteínas, esta región se encuentra muy cerca hacia el extremo carboxilo de los residuos de lisina que son acetilados por p300: K19, K20, K39 en Smad2 (54, 55) y K64, K70 en Smad7 (48) (Figura 78 B). Además, Smad2 presenta un alto grado de homología de secuencia con Smad3, especialmente en sus dominios MH1 y MH2 (11, 197). La

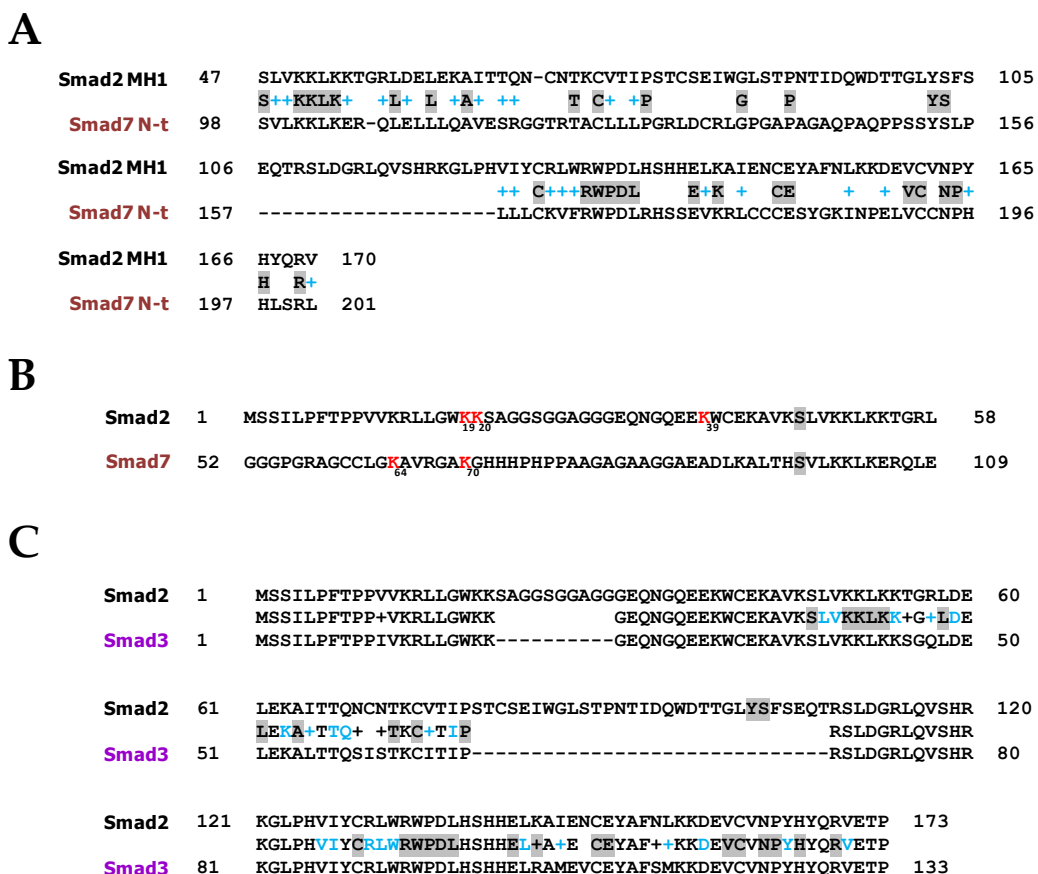


Figura 78. Similitud de secuencia en los dominios de unión a Sirt1 de Smad2 y Smad7. A. Alineación de la secuencia proteica del dominio MH1 de Smad2 y el extremo amino terminal de Smad7. Se destaca en sombreado gris las zonas con homología 100% y en azul los aminoácidos de estructura similar. B. Secuencia adyacente a la región homóloga entre Smad2 y Smad7. Se destacan en rojo las lisinas que se acetilan por p300 y en sombreado gris el comienzo de la región homóloga. C. Alineación de la secuencia proteica del dominio MH1 de Smad2 y Smad3. Se destacan en sombreado gris y azul las regiones homólogas 100% y aminoácidos de estructura similar, respectivamente, detectadas en A.

secuencia proteica de Smad2 que presenta homología con Smad7 (Figura 78 A), también se encuentra conservada en Smad3 (Figura 78 C). La similitud de secuencia entre Smad2, Smad7 y Smad3 sugiere que esta región podría ser la implicada en la unión de Sirt1 a estas proteínas. Sin embargo, para determinar el motivo de unión con más precisión sería preciso realizar experimentos de mutagénesis dirigida de dicha región. Además del dominio MH1, hemos determinado que Smad2 interacciona con Sirt1 mediante una zona incluida entre los aminoácidos 173 y 468 (dominios L y MH2). Smad3 y Smad4 poseen el dominio SAD, un dominio de activación transcripcional situado hacia el extremo carboxilo terminal del dominio Linker, con el que interaccionan con p300. El dominio SAD es esencial para la actividad transcripcional de Smad3 y Smad4 (73, 74) y también media la interacción con diferentes activadores y represores transcripcionales (10). Smad2 y Smad3 están altamente conservadas en su extremo amino y carboxilo terminal, pero presentan más diferencias en su dominio Linker (11, 197). Si el dominio Linker de Smad2 también contiene un dominio similar al dominio SAD de Smad3 y Smad4 que se une a diferentes activadores o represores transcripcionales aún no se ha determinado (74). La región a través de la que Smad2 se une a Sirt1 solapa con la zona donde se sitúa el dominio SAD en Smad3 y Smad4. La zona a través de la que se une Smad2 a Sirt1 podría ser un dominio similar al dominio SAD por el que interacciona con diferentes activadores y represores transcripcionales.

Por otro lado, determinamos qué dominios de Sirt1 son los responsables de la interacción con Smad2. Sirt1 presenta un dominio catalítico central dependiente de NAD⁺ altamente conservado entre los diferentes miembros de la familia de las Sirtuinas. A ambos lados de este dominio central encontramos las regiones amino y carboxilo terminal no conservadas (78, 81). Los extremos amino y carboxilo terminal de la proteína Sirt1 potencian la actividad desacetilasa de su dominio catalítico (223). Hemos determinado, en este trabajo, que Sirt1 interacciona con Smad2 a través de su extremo amino terminal; una zona incluida entre los aminoácidos 1 y 364 (fragmentos A y B de Sirt1). Con el fragmento A por sí solo se detecta una interacción leve mientras que con el fragmento B no se detecta ninguna interacción. Los fragmentos B y C comprenden el dominio catalítico de la proteína Sirt1 que va desde el aminoácido 244 al 498 (100). El hecho de que el fragmento A de Sirt1 sea suficiente para interaccionar

con Smad2, apunta a que la interacción entre Smad2 y Sirt1 se produce con la región variable de Sirt1, y sugiere, por lo tanto, que el dominio catalítico conservado no toma parte en la interacción. Esto concuerda con el hecho de que en la búsqueda del Sistema Doble Híbrido Cyto Trap® sólo encontramos Sirt1 y no encontramos ninguno de los otros miembros de la familia de las Sirtuinas. Además, la interacción que detectamos de Smad2 con el fragmento AB es más intensa que la detectada para la proteína completa. Esto sugiere que dicho fragmento pudiera tener zonas de unión a Smad2 que quedan expuestas cuando la proteína está dividida en dominios/regiones. Dichos dominios podrían quedar ocultos, total o parcialmente, en la proteína completa. Smad2 se une a través de su dominio MH2 a una región rica en prolinas denominada dominio SIM presente en FoxH1 y FoxH1b, y el dominio FM, un dominio específico de FoxH1 (67). Puesto que Smad2 también se une a Sirt1 a través de parte de su dominio MH2, realizamos una búsqueda en la secuencia de Sirt1 de motivos similares a SIM y FM. No encontramos motivos similares a SIM y FM en la zona de unión para Smad2 detectada en Sirt1 (aminoácidos 1-364). Por otro lado, SKIP interacciona con la región comprendida entre los aminoácidos 114-217 de Sirt1 (224), zona que forma parte de los fragmentos A y B. Estos datos nos llevan a pensar en la posibilidad de que exista un motivo de unión para diferentes factores de transcripción y cofactores en la zona comprendida entre los aminoácidos 1 y 364 de Sirt1 (fragmentos A y B). Por tanto, el estudio del dominio de Sirt1 responsable de la interacción con Smad2 se plantea como un interesante objeto de estudio futuro en nuestro laboratorio.

IV.9. Sirt1 se une a Smad3 *in vivo* e *in vitro*.

Tras la estimulación con TGF β , Smad3 es fosforilada en su extremo carboxilo terminal (5). Smad3 tiene un alto grado de homología de secuencia con Smad2, especialmente en sus dominios MH1 y MH2 (11, 197). Sin embargo, al carecer del exón 3 de Smad2, Smad3 se une directamente al DNA mediante su dominio MH1 (11). En respuesta a TGF β , Smad3 es también acetilada por p300/CBP, lo que regula positivamente su actividad transcripcional (57). Sin embargo, la acetilación de Smad3 es mucho menos patente a la encontrada en Smad2 (54). En el curso de este trabajo fue

descrita la proteína Sirt1 como una proteína capaz de desacetilar Smad3 (58). Aunque Smad2 ha sido la molécula que utilizamos en la búsqueda con el Sistema Doble Híbrido Cyto Trap[®] y con la que hemos detectado originariamente la interacción con Sirt1, quisimos comprobar si Sirt1 interacciona con Smad3. En este trabajo, hemos mostrado que Sirt1 interacciona *in vivo* e *in vitro* con Smad3. En experimentos de sobreexpresión en células HEK293T, la interacción entre estas dos proteínas no varía con la estimulación con TGF β . Otros autores han descrito, en células de fibroblastos de ratón NRK49F, que la interacción entre Sirt1 y Smad3 se incrementa tras la estimulación con TGF β (58). Quizá la discrepancia observada en la dependencia o independencia de la señalización de TGF β y la interacción de Smad3 y Sirt1, se deba al uso de líneas celulares diferentes en ambos estudios. Además, en experimentos realizados en nuestro laboratorio comparando la interacción entre Sirt1 y Smad2 ó Smad3, se observó que la interacción entre Sirt1 y Smad3 es más intensa que la encontrada con Smad2, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Hasta el momento no se dispone de un anticuerpo adecuado que inmunoprecipite Smad3 independientemente de Smad2. Además, el estudio de la acetilación de Smad3 marcada con el epitopo flag no ha sido factible. Todo esto nos imposibilitó el estudio de la interacción entre las proteínas endógenas Sirt1 y Smad3, y poder comprobar, tal y como se ha descrito previamente en Li *et al* (58), que Sirt1 desacetila Smad3.

IV.10. En células estimuladas con TGF β , Sirt1 colocaliza en el núcleo con Smad2.

La localización subcelular de una proteína es un mecanismo celular importante para regular su función. Dicha localización subcelular puede variar con estímulos fisiológicos y estados patológicos. Aunque, en estado de reposo, Smad2 entra y sale del núcleo continuamente, esta proteína es estadísticamente más abundante en el citoplasma. Tras la estimulación con TGF β , los complejos formados por las R-Smads y Smad4 se translocan al núcleo donde modifican la transcripción de un gran número de genes (5, 20, 22). El transporte núcleocitoplasmático que experimentan las Smads en

respuesta a TGF β provee un sistema de regulación celular con el que las Smads pueden monitorizar la actividad de los receptores y dinamizar la respuesta a TGF β , lo que es esencial para los organismos multicelulares (22, 23). Típicamente, Sirt1 presenta una localización subcelular nuclear que puede variar durante el desarrollo embrionario, en diferentes tejidos y en la diferenciación celular (26). La regulación de la localización subcelular de Sirt1 es muy importante para su función (92, 108). Por ejemplo, la exclusión nuclear de Sirt1 promueve la apoptosis en respuesta al estrés oxidativo (26). La localización subcelular de Sirt1 está regulada, entre otras, por vías de señalización como IGF-PI3K-Akt (26, 199), el estrés oxidativo (200), la fosforilación de Sirt1 por JNK1 (112) y estímulos que provocan diferenciación celular (201).

En células HEK293T, hemos mostrado que la localización subcelular de Sirt1 varía con la estimulación con TGF β ; Sirt1 se vuelve completamente nuclear y colocaliza en el núcleo con Smad2, obteniendo para ambas proteínas un coeficiente de colocalización cercano a 1. También hemos mostrado, que Smad2 y Sirt1 colocalizan en el núcleo en células HaCaT, aunque en esta línea celular no se produce la exclusión citosólica tan patente de Sirt1 tras la estimulación de las células con TGF β . La colocalización de ambas proteínas en el núcleo concuerda con el hecho de que la interacción entre Sirt1 y Smad2 aumente con la estimulación con TGF β . Este dato indica que, tras la estimulación con TGF β , ambas proteínas tienen la misma localización nuclear lo que apunta a una relación funcional entre Smad2 y Sirt1. Así, estos datos sugieren una posible implicación de Sirt1 en la transcripción dependiente de TGF β junto con Smad2. Si la localización del total de la proteína Sirt1 en el núcleo es dependiente de la localización nuclear de las Smads o no, en respuesta a TGF β , es un punto que queremos abordar en un futuro.

IV.11. Sirt1 se une a promotores de genes dependientes de TGF β .

Tras la estimulación con TGF β , los complejos de las Smads entran al núcleo junto con otros factores de transcripción donde regulan la expresión de un gran número de genes (5, 19). Sirt1 tiene más afinidad por Smad2 en respuesta a TGF β y, aunque hemos visto que, en extractos proteicos totales, Sirt1 no se une a Smad2

fosforilada ni forma un complejo con Smad4, experimentos *in vitro* muestran que la interacción entre Sirt1 y Smad2 es potenciada cuando Smad2 está fosforilada. Además, Smad2 y Sirt1 colocalizan en el núcleo tras la estimulación con TGF β . Todo esto nos llevó a pensar que ambas proteínas podrían llevar a cabo, de manera conjunta, labores de regulación de la transcripción dependiente de TGF β . En este trabajo, hemos mostrado que Sirt1 se integra, tras la estimulación con TGF β , en un complejo con Smad2, Smad3 y Smad4 a elementos reguladores de promotores de genes que responden a TGF β : *c-jun* SBR (163, 202) y DE (66, 68, 155). Además, esta unión de Sirt1 no interfiere en la unión de las Smads a los mencionados promotores. Sirt1 carece de dominio de unión al DNA y por tanto no se conoce que se una a éste directamente. Para llevar a cabo su actividad desacetilasa, Sirt1 se une al DNA a través de diferentes factores de unión al DNA (104, 225). Hemos mostrado que Sirt1 tiene cierta capacidad de unión al DNA independientemente de la unión de Smad2, Smad3 y Smad4; aunque dicha unión sí requiere de proteínas adicionales presentes en el extracto nuclear. Además, hemos demostrado que Sirt1 se une al complejo de las Smads antes o durante la formación del complejo con *c-jun* SBR para constituir un complejo Smads/Sirt1/DNA. Una vez que las Smads se han unido al DNA, Sirt1 no se recluta con la misma afinidad a los complejos formados por estas proteínas. Todos estos datos sugieren que Sirt1 tiene cierta capacidad de unirse al DNA en ausencia de los complejos específicos de las proteínas Smads y la incorporación de las Smads incrementa la unión de Sirt1 a secuencias específicas del DNA. El conocimiento de las proteínas a través de las cuales Sirt1 se pudiera unir al DNA en ausencia de las proteínas Smad es un asunto que pretendemos abordar en un futuro.

En los complejos que hemos caracterizado por su unión al DNA en respuesta a TGF β , encontramos las proteínas Sirt1, Smad2 fosforilada, Smad3 fosforilada y Smad4. Este último dato corrobora los resultados de His-Pulldown donde mostramos que Sirt1, *in vitro*, se une a Smad2 fosforilada con mayor afinidad que a la no fosforilada. Sin embargo, estos datos son aparentemente contradictorios con los obtenidos en experimentos de co-inmunoprecipitación *in vivo*, que muestran que Sirt1 no forma un complejo con Smad4 y Smad2 fosforilada. Teniendo todo esto en cuenta, los resultados obtenidos del DNAP sugieren que, en el contexto del DNA, Sirt1 es capaz de

interaccionar con Smad2/Smad3 fosforiladas y Smad4 para unirse a promotores de genes específicos dependientes de TGF β . Podemos especular que el complejo Smad2 fosforilada/Smad4, unido al DNA, experimenta un cambio conformacional que permita la unión de Sirt1 al citado complejo. Sin embargo, en ausencia de DNA como es el extracto proteico de una inmunoprecipitación, la interacción Sirt1/Smad4 no es favorable y la interacción Sirt1/Smad2 fosforilada es posible que esté competida por Smad4 u otras proteínas, por lo que no la podemos detectar. Aún así, no podemos descartar la co-existencia en el DNA de diferentes complejos: Sirt1/Smad4/Smad2 fosforilada, Smad4/Smad2 fosforilada, Sirt1/Smad2 fosforilada, y Sirt1/Smad2 no fosforilada, que podría cada uno mediar la transcripción de diferentes genes. Estos datos se pretenden evaluar utilizando ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

Significativamente, el hecho de que Sirt1 se una a promotores específicos sensibles al estímulo con TGF β , firmemente sugiere que Sirt1 está participando junto con las Smads en la transcripción dependiente de TGF β .

IV.12. Sirt1 inhibe la activación transcripcional de genes dependientes de TGF β en ensayos con genes reporteros.

Como hemos comentado previamente, el hecho de que Sirt1 se una, junto con las Smads, a promotores de genes específicos sugiere que Sirt1 pudiera desempeñar un papel en la transcripción de genes dependientes de TGF β . Hemos determinado el efecto de la sobreexpresión de Sirt1 sobre dos genes cuya transcripción es estimulada por TGF β y que son dependientes de Smad2 y Smad4: ARE (21, 64-66) y DE (21, 66, 68, 155). En nuestras manos, la sobreexpresión de Sirt1 tiene un efecto negativo sobre la transcripción inducida por TGF β de los genes reporteros DE-Luc y ARE-Luc que es dependiente de la actividad desacetilasa de Sirt1. Adicionalmente, la disminución de los niveles de Sirt1 por dos siRNA específicos para Sirt1 aumenta la transcripción dependiente de TGF β del gen reportero DE-Luc. Sirt1 modula la transcripción a través de la formación de heterocromatina mediante la desacetilación y metilación de histonas, la metilación del DNA (71, 102, 120) y la desacetilación de enzimas

relacionadas con modificaciones de la cromatina como son las acetiltransferasas de histonas p300 y PCAF (78, 125). Sirt1 también induce el silenciamiento de genes a través de su interacción y desacetilación de factores de transcripción y co-reguladores implicados en la transcripción de determinados genes (78, 120). Puesto que el DNA plasmídico transfectado transitoriamente se organiza con el ensamblaje de nucleosomas (53, 226), la inhibición de la transcripción de los genes reporteros DE-Luc y ARE-Luc, mediada por Sirt1, podría ser explicada tanto por la desacetilación de factores de transcripción o de co-reguladores implicados en la transcripción de estos genes dependientes de TGF β como por la remodelación de la cromatina circundante (53). Ambas posibilidades han de tenerse en cuenta a la hora de determinar el efecto de Sirt1 sobre la transcripción dependiente de Smad2 y Sirt1.

IV.13. En un subconjunto de genes, la inhibición de Sirt1 antagoniza la transcripción dependiente de TGF β .

Las proteínas Smads regulan la transcripción de numerosos genes en respuesta a TGF β . Además de unir factores de transcripción que colaboran con las Smads para controlar la transcripción de determinados genes, las Smads cooperan e interaccionan con moléculas coactivadoras o correpressoras que modifican el estado de la cromatina o que reclutan componentes de complejos remodeladores de cromatina. De esta manera, se puede entender la amplitud de la activación de la transcripción dependiente de TGF β y las Smads (63). Por ejemplo, p300 es reclutado a los promotores dependientes de Smad2 y acetila específicamente los residuos de lisina 9 y 18 de la histona H3 (53). Esta interacción es esencial para la actividad transcripcional que aporta el complejo de las Smads (53). Smad2 también recluta a Brg1, un componente ATPasa del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF, que es requerido para la activación transcripcional de TGF β mediada por Smad2 (53). Por lo tanto, Smad2 activa indirectamente la transcripción reclutando la maquinaria de transcripción a los promotores de DNA y remodelando la cromatina por modificación de las histonas mediante p300, Brg1 y probablemente otras enzimas (5, 53). Las Smads también reclutan proteínas que reprimen la transcripción dependiente de TGF β . El

reclutamiento de HDACs a los promotores resulta en la desacetilación de las histonas circundantes lo que genera un entorno de cromatina más restrictivo que inhibe la transcripción (63).

Sirt1 modula la transcripción a través de la formación de heterocromatina. Sirt1 produce la desacetilación de histonas y su metilación a través del reclutamiento de metiltransferasas, y la metilación del DNA (71, 102, 120). Sirt1 desacetila los residuos de las histonas H3K9, H3K14, H3K56, H4K16 y H1K26 (102, 104), y también produce la desacetilación de enzimas relacionadas con modificaciones de la cromatina como las acetiltransferasas de histonas p300 y PCAF (78, 125). Finalmente, Sirt1 modula la transcripción mediante la desacetilación de co-reguladores y factores de transcripción específicos. La desacetilación por Sirt1 modifica la actividad de esos factores y, por tanto, afecta a la transcripción de los genes que regulan (78, 120).

Nuestro resultados muestran que Sirt1 interacciona con Smad2. Esta interacción se incrementa en respuesta a TGF β y necesita de la actividad catalítica de Sirt1. Sin embargo, Sirt1 no está involucrada en la modificación del estado de acetilación de Smad2. Sirt1 y Smad2 colocalizan en el núcleo tras la estimulación con TGF β . Adicionalmente, también hemos mostrado que Sirt1 es reclutada junto a las Smads a promotores de genes dependientes de TGF β e inhibe la activación transcripcional dependiente de TGF β y Smad2. Teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto, proponemos que Sirt1, en su interacción con Smad2, sería llevada a regiones concretas del DNA donde podría estar contribuyendo a la desacetilación de varias proteínas: histonas, factores que están implicados en la remodelación de la cromatina, por ejemplo p300, o factores de transcripción implicados en la respuesta transcripcional a TGF β . En todos los casos se produciría la inhibición de la transcripción de genes en respuesta al estímulo con TGF β . De hecho, Smad2 recluta a p300 a promotores concretos donde induce la acetilación de la H3K9 y H3K18 (125). Sirt1 desacetila la H3K9 (102) y por tanto podría mediar en la regulación negativa de la transcripción de genes concretos en respuesta a la estimulación con TGF β . Existen varios ejemplos en la literatura que describen cómo Sirt1 es reclutado a los promotores por diversos factores de transcripción y co-factores para modificar la estructura de la cromatina y así influir

en la transcripción de determinados genes. Por ejemplo, los correpresores BCL11A y BCL11B, implicados en desarrollo y en enfermedades de células hematopoyéticas, reprimen la transcripción reclutando a Sirt1 a los promotores de los genes diana para desacetilar las histonas H3 y H4 (227, 228). También, SHP, un correpresor de una gran variedad de receptores nucleares, interacciona con Sirt1 y la recluta a los promotores de los genes *CYP7A1* y *SHP* para inhibir su actividad transcripcional también a través de la desacetilación de las histonas H3 y H4 (229). Finalmente, el receptor de andrógenos (AR) recluta también a Sirt1 y otros correpresores a promotores de genes dependientes de AR, donde desacetila la histona H3 y reprime la transcripción (196). Por tanto, el reclutamiento de Sirt1 por Smad2 para la regulación de la transcripción dependiente de TGFβ es un modelo plausible y que podría encuadrarse dentro de uno de los mecanismos utilizados por las Smads, el reclutamiento de HDACs a los promotores, para la regulación negativa de la transcripción.

Para averiguar la posible función de Sirt1 sobre la inhibición de la transcripción de genes dependientes de TGFβ analizamos la expresión, en respuesta a TGFβ, de la totalidad de los genes mediante la técnica del RNA-Seq, y la comparamos con la expresión en presencia de dos inhibidores de la actividad de Sirt1, EX527 (56, 72) y HR73 (72, 209). Consideramos que, de estar Sirt1 implicada en la transcripción negativa de determinados genes, la inhibición de la actividad de Sirt1 debería modificar la respuesta transcripcional de algunos genes al estímulo con TGFβ. Se analizaron los genes cuya respuesta a TGFβ era alterada por el tratamiento de EX527 y HR73. Elegimos los genes para los que ambos inhibidores tuvieran efecto sobre la transcripción dependiente de TGFβ, para así poder eliminar los genes en los que el efecto de los inhibidores EX527 y HR73 sobre su expresión inducida por TGFβ fuera debido a la actuación sobre dianas diferentes a Sirt1. Tras el complejo filtrado del conjunto de genes obtenidos del RNA-Seq, mostramos que la inhibición de Sirt1 tiene diferentes consecuencias relacionadas con el efecto regulador de TGFβ. Por un lado, antagoniza las actividades reguladoras negativas de TGFβ sobre genes tales como *CCDC34* y *CFL2*. Por otro lado, la inhibición de Sirt1 también antagoniza las actividades reguladoras positivas de TGFβ sobre genes tales como *CDK3* y *ANKRD9*. Estos resultados sugieren que Sirt1 podría estar involucrado en la regulación negativa

de la transcripción dependiente de TGF β de cierto grupo de genes, mientras que en otros genes intervendría en la activación de la transcripción dependiente de TGF β .

Hemos mostrado que, en una proporción importante de los genes seleccionados tras el filtrado de los resultados del RNA-Seq, la unión de GFP-Smad2 a zonas promotoras/*enhancer* se incrementa tras la estimulación de las células con TGF β : encontramos un aumento de la unión de GFP-Smad2 a las zonas caracterizadas como promotor (H3K4me3) y/o *enhancer* (H3K4me1) y a las zonas hipersensibles al corte por DNAasa I, marca de cromatina abierta y accesible, en respuesta al estímulo celular con TGF β . Este dato indica que Smad2 está implicado en la transcripción dependiente de TGF β de estos genes, cuya expresión se altera por la inhibición de Sirt1. Estos datos sugieren la primera relación directa entre Smad2 y Sirt1 en la transcripción dependiente de TGF β . Por otro lado, encontramos un conjunto de genes que son sensibles a la estimulación por TGF β y que están afectados por la inhibición de Sirt1, pero que no muestran Smad2 unido a sus zonas promotoras/*enhancer* tras la estimulación con TGF β . Podemos especular que, en estos genes, Smad3 podría estar involucrada en su regulación. Está descrito que Smad3 es acetilada por TGF β lo que regula positivamente la actividad transcripcional de Smad3 (54, 57). Sirt1, por otro lado, interacciona con Smad3 desacetilándola e inhibiendo su actividad transcripcional (58). Smad2 y Smad3 poseen funciones diferentes en la señalización de TGF β , participando en la regulación de genes distintos (230). Por tanto, es posible pensar que Sirt1 podría ser reclutada por Smad3 a otro conjunto de genes y actuar sobre la transcripción a través de la desacetilación de Smad3 u otros factores de transcripción o modificando el estado de la cromatina a través de la desacetilación p300 y/o de las histonas circundantes. De esta manera, se puede pensar que Sirt1, en los genes regulados por TGF β y Smad3, podría estar inhibiendo la transcripción al desacetilar directamente a Smad3, a diferencia del modelo propuesto para Smad2 (ver figura 61). En nuestros experimentos de DNAP, Sirt1 se integra para formar un complejo con Smad3 en elementos reguladores de promotores de genes que responden a TGF β , lo que fundamenta esta hipótesis. Con el fin de comprobar la posibilidad de que Smad3 pudiera estar unida a los promotores de estos genes, realizamos una búsqueda en las bases de datos de ChIP-Seq para Smad3 previamente realizados por otros laboratorios.

Sin embargo, no encontramos en ninguna base un conjunto de datos de ChIP-Seq para Smad3 similar al de Smad2 para poder analizar. También podemos pensar, que la transcripción de dichos genes esté regulada por rutas no canónicas de TGFβ independientes de las Smads (28-30), donde Sirt1 desempeñe un papel regulador.

Los resultados del análisis del RNA-Seq muestran que el efecto antagonista de la inhibición de Sirt1 sobre la transcripción de genes dependiente de TGFβ no es un efecto transitorio, si no que es persistente en el tiempo: si el efecto más potente del inhibidor es a la hora de tratamiento con TGFβ, en la mayoría de genes, el efecto persiste hasta las 6 horas de tratamiento. Si el efecto más potente detectado del inhibidor es a las 6 horas de tratamiento con TGFβ, el efecto, aunque de menor grado, ya es detectado a la hora de tratamiento. Este análisis se realizó sobre genes donde encontramos un incremento de unión de Smad2 a sus zonas promotoras/*enhancer* tras la estimulación con TGFβ. Todo esto indica que el efecto de Sirt1 sobre la transcripción de los genes dependientes de TGFβ que tienen unido Smad2 tras dicho tratamiento, es un efecto prolongado. Aunque dicho efecto sea más patente a tiempos cortos o tiempos largos del tratamiento con TGFβ, dependiendo de cada gen.

Además, hemos mostrado que las consecuencias sobre la transcripción dependiente de TGFβ del uso de inhibidores de Sirt1 no es un efecto general sobre toda la transcripción regulada por TGFβ. El análisis de algunos genes que no fueron seleccionados en el filtrado de los datos del RNA-Seq cuya expresión es activada (*CDKN1A*, *PMEPAI* y *SMAD7*) o inhibida (*ID3*, *FOXQ1*, *RASSF5*) por la estimulación con TGFβ (62) así lo indica. La inhibición de la actividad de Sirt1, en estos casos, no modifica sustancialmente los perfiles de transcripción. En estos genes, tras el tratamiento con TGFβ, Smad2 también se encuentra unido a las zonas asociadas a promotores/*enhancer*. Estos datos sugieren que aunque Smad2 interacciona con Sirt1 y la recluta para modificar la transcripción de un determinado grupo de genes, el reclutamiento de Sirt1 por Smad2 no es extensivo a todos los genes que son susceptibles de ser regulados por Smad2. Así, podemos afirmar que la técnica de RNA-Seq nos ha permitido identificar un grupo de genes dependientes de TGFβ y Smad2 cuya regulación transcripcional está mediada por Sirt1. Para obtener una

respuesta más contundente acerca del papel de Sirt1 en la regulación de la transcripción de dichos genes, proponemos interferir la expresión de Sirt1 y examinar qué consecuencias tuviera sobre los genes seleccionados por el uso de inhibidores de Sirt1.

Para finalizar, validamos los datos obtenidos del RNA-Seq de los grupos de genes que en su mayoría pertenecen a la categoría donde la inhibición de Sirt1 antagoniza la regulación negativa de la expresión mediada por TGF β , llegando en algunos casos a estimular positivamente la expresión del gen. Los datos obtenidos por qPCR apoyan los resultados obtenidos en el RNA-Seq; la inhibición de Sirt1 impide la regulación negativa por TGF β de la expresión de dichos genes. Ambos inhibidores de Sirt1 reflejan la misma tendencia antagonista, aunque EX527 parece ser más efectivo. Las diferencias entre ambos inhibidores podrían ser explicadas por el hecho de que, mientras que el inhibidor HR73 presenta un IC₅₀ < 5 μ M (72) sobre la inhibición de la actividad de Sirt1, el inhibidor EX527 tiene un IC₅₀ = 60-100 nM (72). Sin embargo, en los datos obtenidos del RNA-Seq, los inhibidores de Sirt1 no muestran diferencias tan acusadas en su efectividad. Las variaciones entre ambos resultados podrían explicarse ya que las aproximaciones experimentales utilizadas para la obtención de los datos son diferentes.

En conclusión, hemos podido demostrar mediante dos aproximaciones distintas que existe una serie de genes para los que la inhibición de Sirt1 impide la regulación negativa de la expresión por TGF β . Esto indica que Sirt1 está mediando la regulación negativa de la transcripción dependiente de TGF β de determinada población de genes. Smad2 tras ser fosforilado y acetilado en respuesta a TGF β , participaría en la regulación negativa de la transcripción dependiente de TGF β de un gran número de genes mediante dos vías: una en la que Smad2 recluta a Sirt1 a promotores de determinados genes para contribuir a la regulación negativa de la transcripción a través de la desacetilación de histonas, de factores implicados en la remodelación de la cromatina o de factores de transcripción implicados en la transcripción de dichos genes (Figura 79 A), y otra vía independiente de la actividad de Sirt1 (Figura 79 B). Cómo los complejos participados por Smad2 discriminan entre ambos tipos de genes es algo que

no podemos contestar en este momento. Por otro lado, Smad3 también podría estar involucrado en la regulación negativa de la transcripción dependiente de TGFβ de otro grupo distinto de genes. Esta regulación de la transcripción podría ser dependiente de Sirt1 (Figura 79 C). Sirt1 podría ser reclutada por Smad3 de una manera similar a la propuesta para Smad2, con la única salvedad que, en este caso, Sirt1 también podría desacetilar directamente a Smad3 para modificar la transcripción dependiente de TGFβ (Figura 79 C). Por último, la regulación negativa de la transcripción dependiente de TGFβ y Smad3 podría ser también independiente de Sirt1 (Figura 79 D).

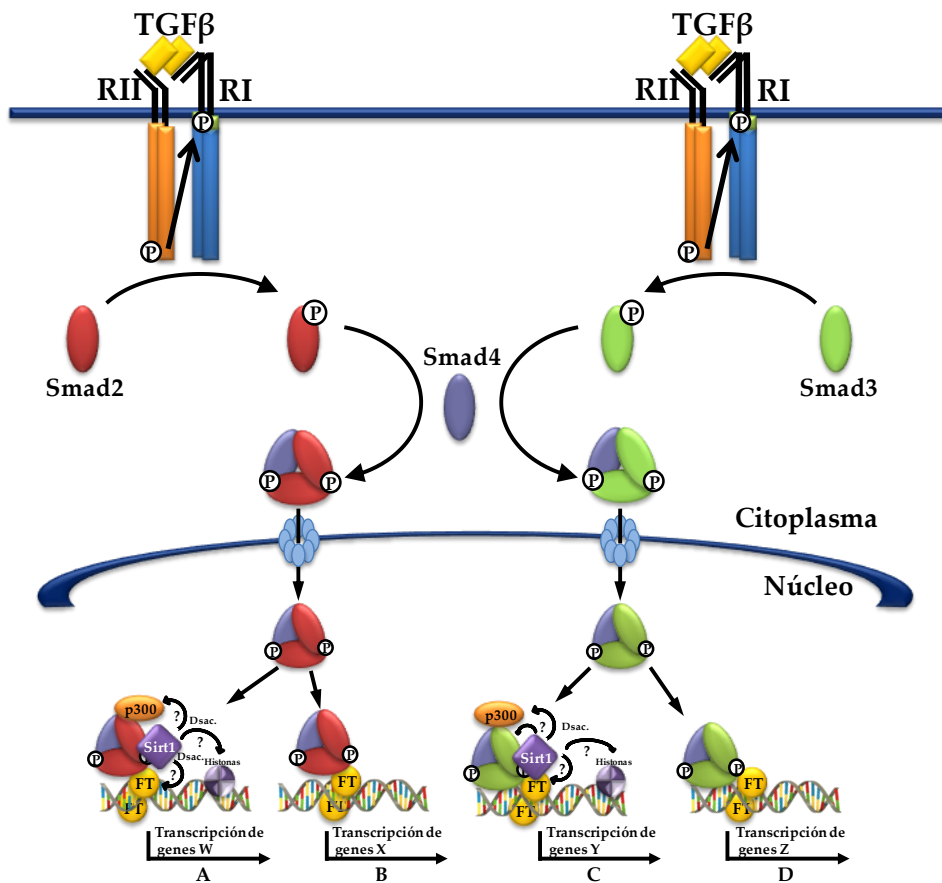


Figura 79. Posibles vías de regulación de la transcripción mediada por TGFβ y Sirt1. La unión de TGFβ al TβRII estimula la formación del complejo receptor heterotetramérico, activando a la quinasa del receptor tipo I. Una vez activado, TβRI fosforila a Smad2 y Smad3. La fosforilación de las R-Smads, mediada por el receptor, provoca cambios conformacionales que llevan a su disociación del TβRI con la consecuente formación de los complejos homoméricos y heteroméricos con Smad4. Estos complejos viajan al núcleo donde regulan la transcripción de gran variedad de genes junto con otros factores de transcripción. A. Regulación de la transcripción mediada por TGFβ dependiente de Smad2 y Sirt1. B. Regulación de la transcripción mediada por TGFβ dependiente de Smad2 pero independiente de Sirt1. C. Regulación de la transcripción mediada por TGFβ dependiente de Smad3 y Sirt1. D. Regulación de la transcripción mediada por TGFβ dependiente de Smad3 pero independiente de Sirt1.

Finalmente, la disección molecular del efecto de Sirt1 sobre la transcripción de los genes en los que la inhibición de Sirt1 antagoniza la regulación positiva de la expresión mediada por TGF β es un reto muy interesante que nos planteamos para el futuro. Podría especularse que Sirt1 estuviera involucrada en el proceso de activación de la transcripción de genes indirectamente regulados por TGF β o que Sirt1 pudiera estar desacetilando proteínas relacionadas con la señalización de TGF β , que al ser desacetiladas potenciarían la señalización de TGF β , por ejemplo Smad7.

IV.14. La señalización de TGF β que implica a Sirt1 está relacionada con procesos biológicos concretos.

Con el fin de averiguar en qué funciones celulares reguladas por TGF β pueda estar involucrada Sirt1, realizamos un análisis funcional de los genes seleccionados en el RNA-Seq: genes regulados por TGF β cuya transcripción está afectada por los inhibidores de Sirt1. Analizamos qué vías de señalización dependientes de TGF β están enriquecidas en genes afectados por la inhibición de Sirt1. Con objeto de extender más el análisis, analizamos los genes donde la inhibición de Sirt1 tiene un efecto antagónico sobre la regulación negativa de la transcripción de TGF β y también los que presentan dicho efecto antagónico sobre la regulación positiva de TGF β , al menos en un punto del curso de la estimulación con TGF β . Para la obtención de estos genes, se realizó un filtrado más permisivo que el que habíamos realizado para el análisis de datos del RNA-Seq: seleccionamos los genes que presentan un valor de Razón ($\log_2(N_{E_{\text{InhibidorTx}}}/N_{E_{\text{DMSOTx}}})$) normalizada mayor de +0,5 ó menor de -0,5 en cualquiera de los tiempos de estimulación con TGF β para cada inhibidor de Sirt1 por separado. Se obtuvieron tras este filtrado 998 genes para el inhibidor EX527 y 1.026 genes para el inhibidor HR73. Para realizar el análisis funcional de estos genes utilizamos la herramienta *Functional Ontology Enrichment: Pathway maps* de la plataforma de metaanálisis GeneGo, METACORE™ (168). Esta herramienta analiza las vías de señalización y/o procesos biológicos en las que están involucrados los genes a estudiar. Además, muestra, entre ellas, las vías de señalización más significativas, a saber, las que se ha identificado un número significativo de genes que se modifican por un

tratamiento determinado con respecto al número de genes total involucrados en dicha vía de señalización. El análisis funcional de los genes afectados por los dos inhibidores de Sirt1, muestra las vías de señalización más significativas en las que están involucrados dichos genes. Estas vías de señalización fueron jerarquizadas en orden de importancia atendiendo al número de genes modificados por la inhibición de Sirt1, tanto por EX527 como por HR73, con respecto al total de genes involucrados en esa vía de señalización (Tabla 41). Del análisis funcional seleccionamos las 10 vías de señalización más significativas para ambos inhibidores de Sirt1. Todos estos grupos se pueden clasificar en 4 grupos de función más generales: desarrollo (EMT), respuesta inmune, adhesión celular y remodelación del citoesqueleto (Tabla 41). Realizamos el mismo análisis funcional con la lista de genes obtenida en el RNA-Seq que son

VÍA DE SEÑALIZACIÓN	Nº GENES EN DATOS	Nº GENES TOTAL	pVALUE (HR73)	pVALUE (EX527)	pVALUE (TGFβ)
Desarrollo _Regulación de transición epitelio-mesénquima (EMT)	14	64	2,189E-07	2,726E-03	6,226E-07
Desarrollo _Inducción EMT dependiente de TGFβ vía Smads	9	35	5,106E-06	1,922E-02	7,126E-06
Respuesta inmune _ Vía del complemento inducida por Lectina	9	49	8,910E-06	1,119E-05	7,951E-04
Adhesión celular _ Remodelación de matriz extracelular	10	52	1,480E-05	1,300E-04	5,552E-05
Respuesta inmune _Vía clásica del complemento	9	52	1,480E-05	1,854E-05	1,241E-03
Desarrollo _Inducción de EMT dependiente de TGFβ vía MAPK	10	47	5,058E-05	2,481E-03	1,148E-04
Remodelación citoesqueleto _TGF, WNT y remodelación del citoesqueleto	16	111	7,915E-05	1,036E-04	1,380E-05
Respuesta inmune _ Vía de señalización IL-1	9	44	2,340E-04	2,781E-04	3,453E-04
Respuesta inmune _ Vía de señalización IL-17	10	60	2,979E-04	3,603E-04	9,148E-04
Respuesta inmune _ HSP60 y HSP70/Vía de señalización TLR	9	54	8,466E-04	1,708E-04	3,834E-04

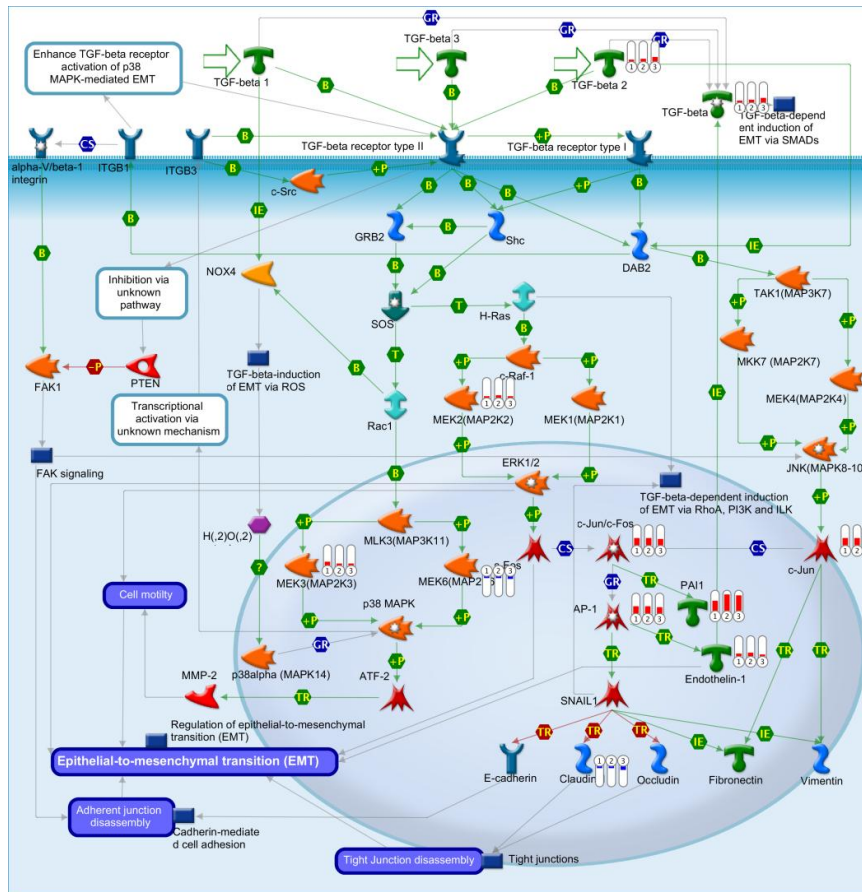
Tabla 41. Análisis funcional de genes regulados por TGFβ cuya transcripción es modificada por los inhibidores de Sirt1, HR73 y EX527. Se detallan las vías de señalización más significativas del análisis, el número de genes modificados por los inhibidores de Sirt1 en esa vía, el número de total de genes implicados en esa vía y los pValue para ambas listas de genes (HR73 y EX527) para esas vías de señalización. Por último se detalla el pValue para la lista de genes modificados por TGFβ (2.045 genes) para esas vías de señalización.

regulados por TGF β (2.045 genes), es decir, genes que presentan una modificación significativa de la transcripción en cualquier punto de estimulación con TGF β ($\log_2(\text{NE}_{1\text{h}} \text{ ó } 2\text{h} \text{ ó } 6\text{hTGF}\beta / \text{NE}_{0\text{hTGF}\beta})$ es mayor de +0,7 o menor de -0,7). Se compararon las vías de señalización más significativas para los genes modificados por los inhibidores de Sirt1 con las más significativas para los genes regulados por TGF β . Encontramos que las 10 vías de señalización obtenidas en el análisis funcional de los dos inhibidores de Sirt1 son también altamente significativas cuando se comparan con las vías de señalización reguladas por TGF β (Tabla 41), indicando que éstas son vías principales para la regulación por TGF β .

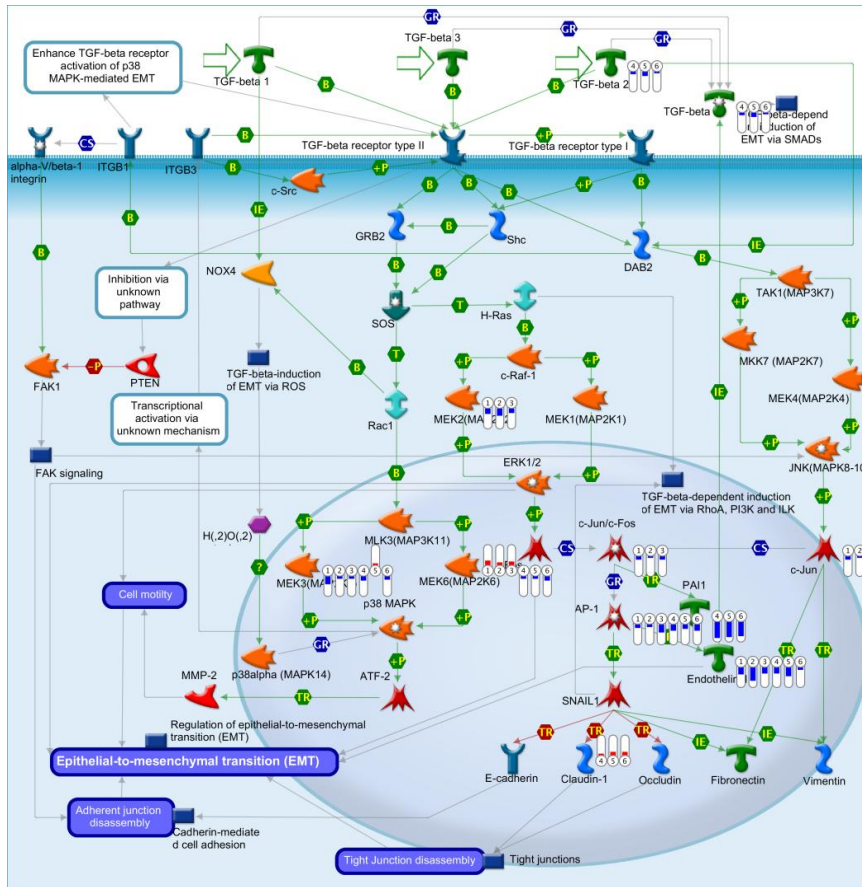
En las figuras 80-83 se presenta un ejemplo de cada una de estas vías de señalización o proceso biológico. En cada una de las vías de señalización seleccionadas se muestra la regulación de la transcripción por TGF β de los genes obtenidos tras el proceso de filtrado del experimento de RNA-Seq. Los termómetros de color rojo y azul al lado del gen correspondiente, representan la variación positiva y negativa, respectivamente, de la transcripción inducida por TGF β para cada uno de los tiempos representados de los genes adyacentes, es decir, la variación de la expresión respecto a la muestra control sin tratar con TGF β . En un gráfico contiguo, también se muestra el efecto de ambos inhibidores de Sirt1 sobre la regulación de TGF β mediante varios termómetros. El color rojo y azul representa el incremento o la disminución, respectivamente, del valor de expresión normalizado de la muestra con inhibidor respecto al valor de la muestra control sin inhibidor. El análisis con más detalle de estas vías de señalización muestra que un gran número de genes con transcripción regulada por TGF β , modifican significativamente sus perfiles de expresión en presencia de los inhibidores de Sirt1 (Figuras 80-83). Además, hay que destacar que, en la mayoría de los genes con respuesta a TGF β , los inhibidores de Sirt1 antagonizan el efecto en la expresión producido por TGF β (Figuras 80-83). Para algunos genes, ambos inhibidores presentan dicho efecto, y para otros genes sólo uno de ellos. En este último caso, no podemos descartar que haya un efecto de ambos inhibidores de Sirt1 sobre la transcripción de estos genes, aunque el efecto para uno de los inhibidores sea menor y haya sido descartado en el proceso de filtrado. Otra posibilidad es que sea debido a la actuación de los inhibidores sobre sustratos diferentes a Sirt1. Con estos resultados

podemos concluir que dentro del gran número de genes que la señalización de TGFβ regula, y por lo tanto, de la gran variedad de vías de señalización en las que toma parte esta citoquina, Sirt1 está implicada en la regulación de genes que se concentran en vías de señalización concretas que están involucradas en funciones celulares específicas: el desarrollo (EMT), la respuesta inmune, la adhesión celular y la remodelación del citoesqueleto. Por tanto, este trabajo de tesis nos ha permitido determinar que la actividad de Sirt1 es importante para la regulación de la expresión de un grupo de genes que son regulados por la señalización de TGFβ y también hemos podido asignar la regulación específica de Sirt1 sobre estos genes a funciones celulares concretas. Así, podemos concluir que la influencia de Sirt1 en la señalización de TGFβ no se generaliza a todo el conjunto de genes que regula TGFβ, sino que está asociada a determinadas funciones celulares. Es de destacar que la EMT, la remodelación del citoesqueleto, la pérdida de la adhesión celular y la supresión del sistema inmune están estrechamente relacionados con la progresión del cáncer, aumento de la invasión y metástasis (3, 8, 77). Tanto la señalización de TGFβ como Sirt1 han sido descritas como inductoras de la EMT (3, 77, 132). Los datos aportados de esta investigación sobre la implicación de TGFβ y Sirt1 sobre la regulación de genes concretos involucrados en EMT, la remodelación del citoesqueleto, la adhesión celular y diferentes vías de señalización del sistema inmune, aporta una información muy valiosa para una búsqueda futura de procedimientos terapéuticos para la lucha contra el cáncer que tengan en cuenta la regulación por Sirt1 de estas funciones celulares dependientes de TGFβ.

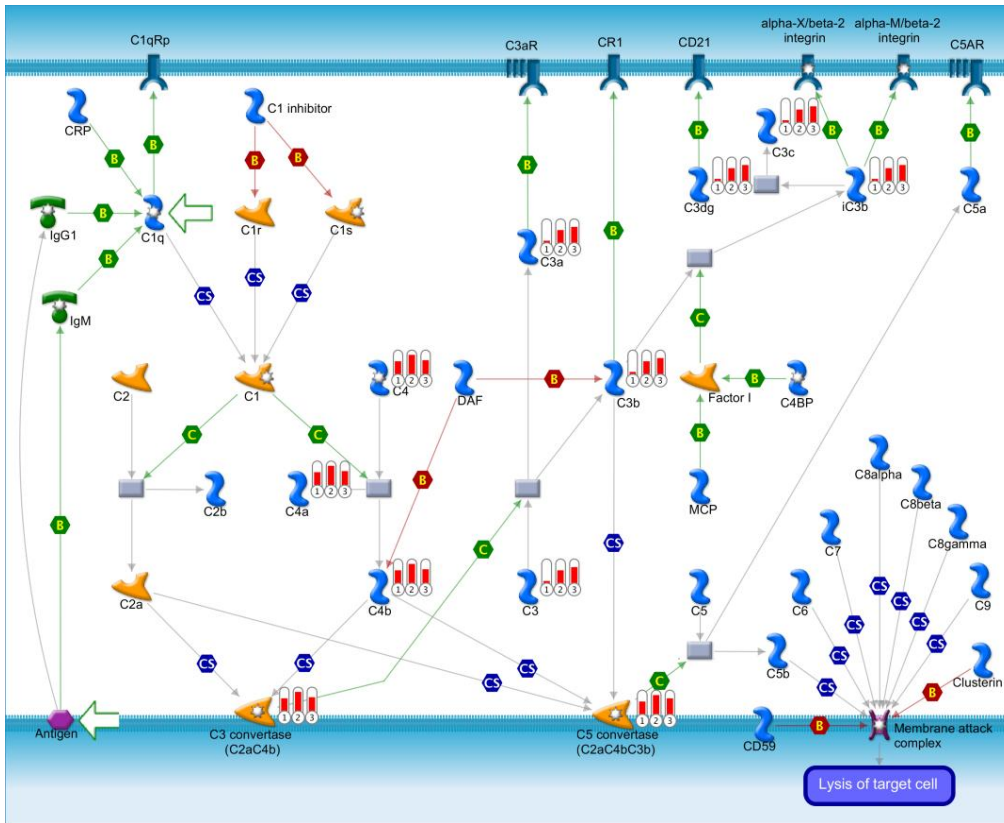
Figura 80. Los inhibidores de Sirt1, EX527 y HR73, afectan a la expresión de genes regulados por TGFβ involucrados en inducción de EMT dependiente de TGFβ vía MAPK. A. Regulación de la transcripción por TGFβ de los genes pertenecientes a esta vía. Se representa la variación de la expresión a 1, 2 y 6 horas con TGFβ con respecto a la muestra control sin tratar ($\log_2 (NE_{1h \text{ ó } 2h \text{ ó } 6hTGF\beta} / NE_{0hTGF\beta})$). Se simboliza como varios termómetros al lado del gen. El color rojo y azul representa la regulación positiva y negativa, respectivamente, de la transcripción dependiente de TGFβ de los genes adyacentes. 1, 2 y 3: 1, 2 y 6 horas con TGFβ, respectivamente. B. Modulación de la transcripción dependiente de TGFβ por los inhibidores de Sirt1, EX527 y HR73, de los genes pertenecientes a esta vía. Se representa la Razón normalizada a 1, 2 y 6 horas del tratamiento con TGFβ ($\log_2 (NE_{InhibidorTx} / NE_{DMSOTx})$), es decir, la modificación de la transcripción de dichos genes por los inhibidores de Sirt1 con respecto a la muestra control sin inhibidor. Se simboliza como varios termómetros al lado del gen. El color rojo y azul representa el incremento o la disminución, respectivamente, de valor de expresión normalizado de la muestra con inhibidor respecto al valor de la muestra control sin inhibidor. 1, 2 y 3: 1, 2 y 6 horas con TGFβ y EX527. 4, 5 y 6: 1, 2 y 6 horas con TGFβ y HR73.



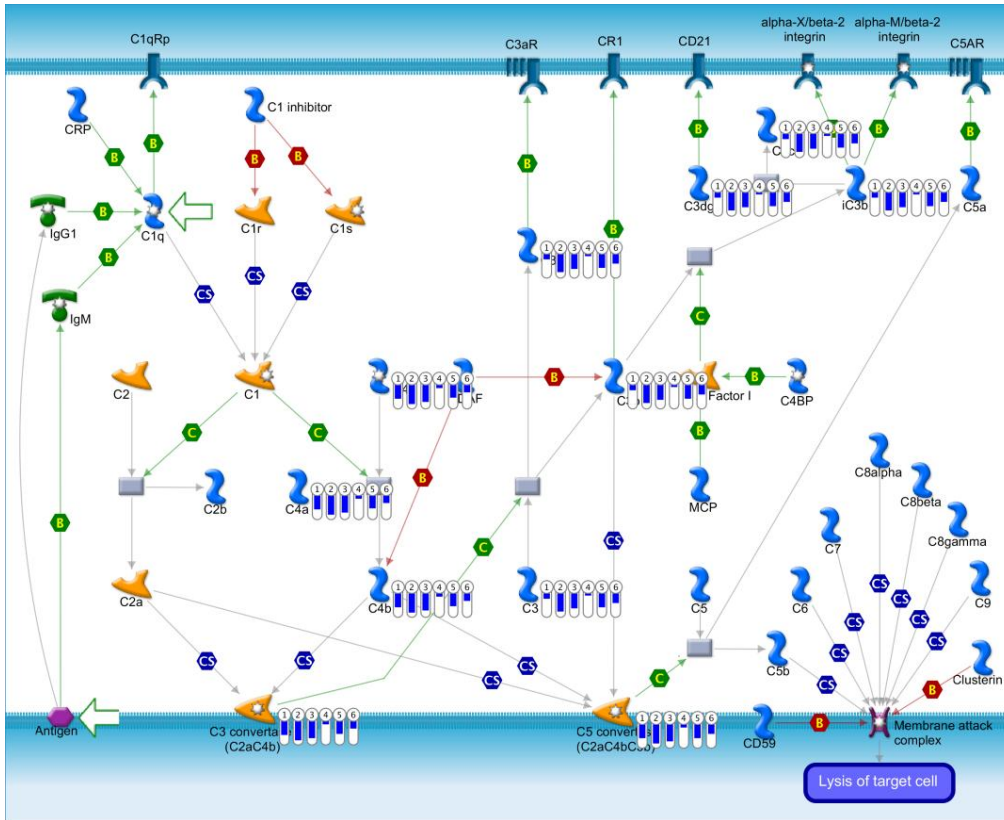
Regulación de TGFβ



Efecto de los inhibidores, EX547 y HR73, sobre la regulación de TGFβ

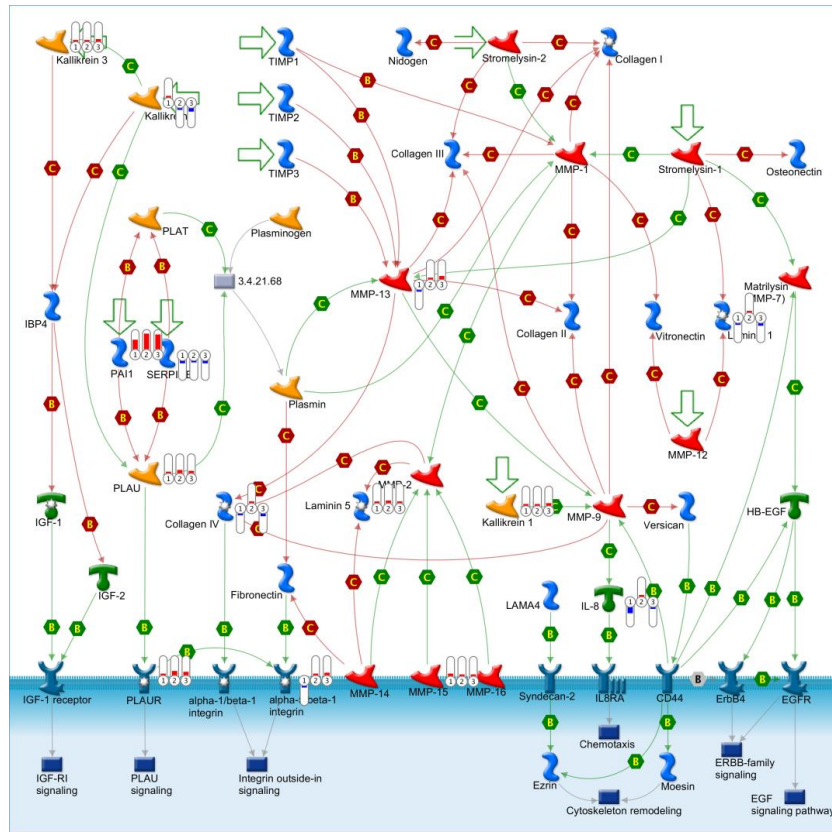


Regulación de TGFβ

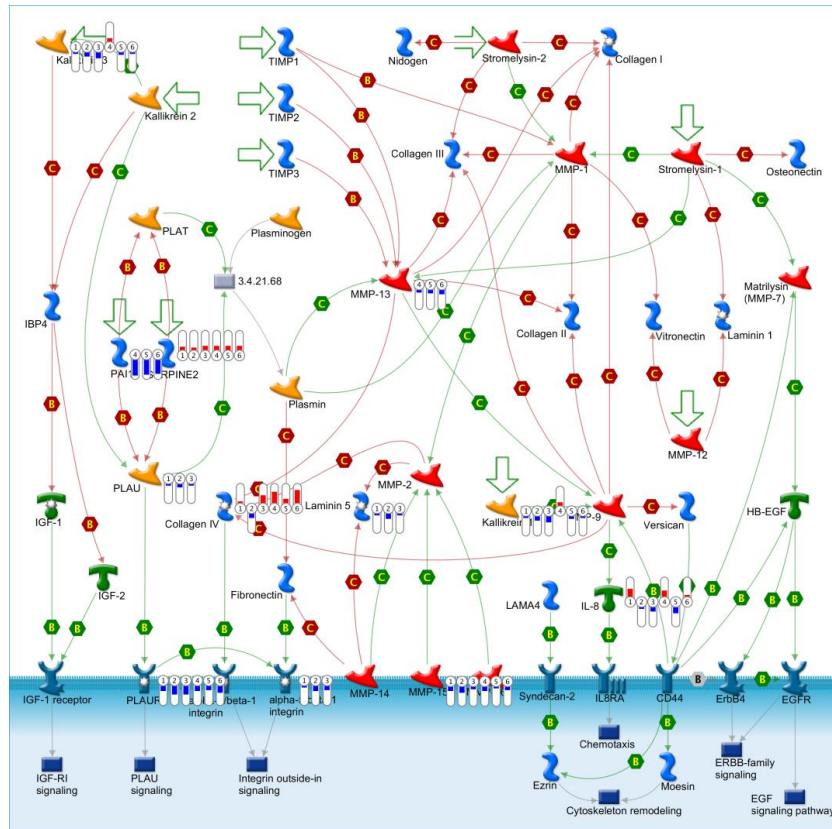


Efecto de los inhibidores, EX547 y HR73, sobre la regulación de TGFβ

Figura 81. Los inhibidores de Sirt1, EX527 y HR73, afectan a la expresión de genes regulados por TGFβ que están involucrados en vía clásica del complemento. Para ver detalles de figura, ver pie de figura 80.

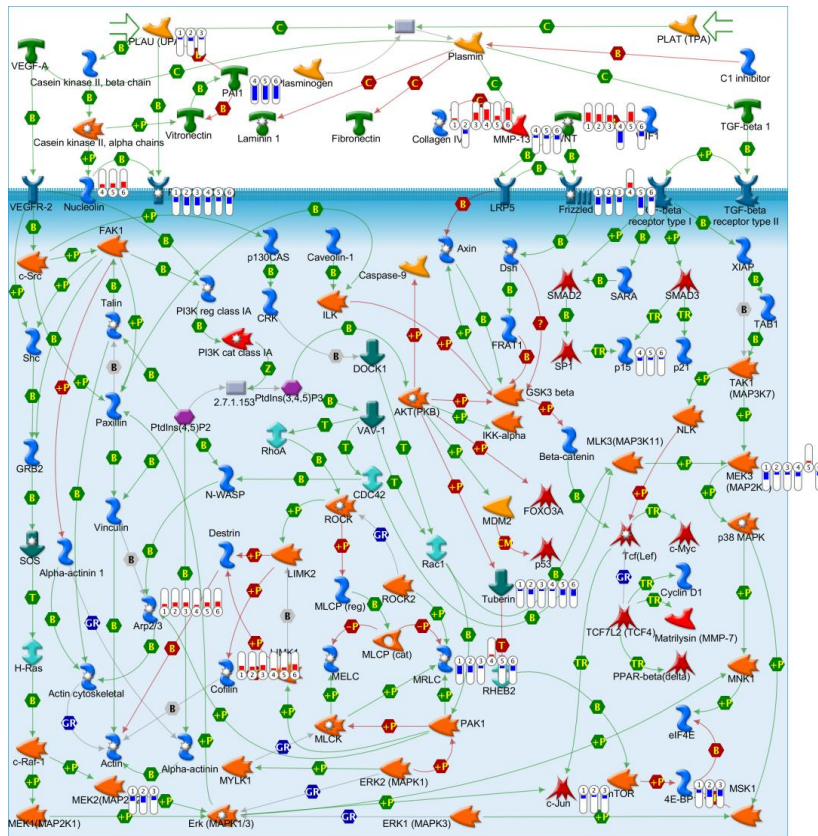
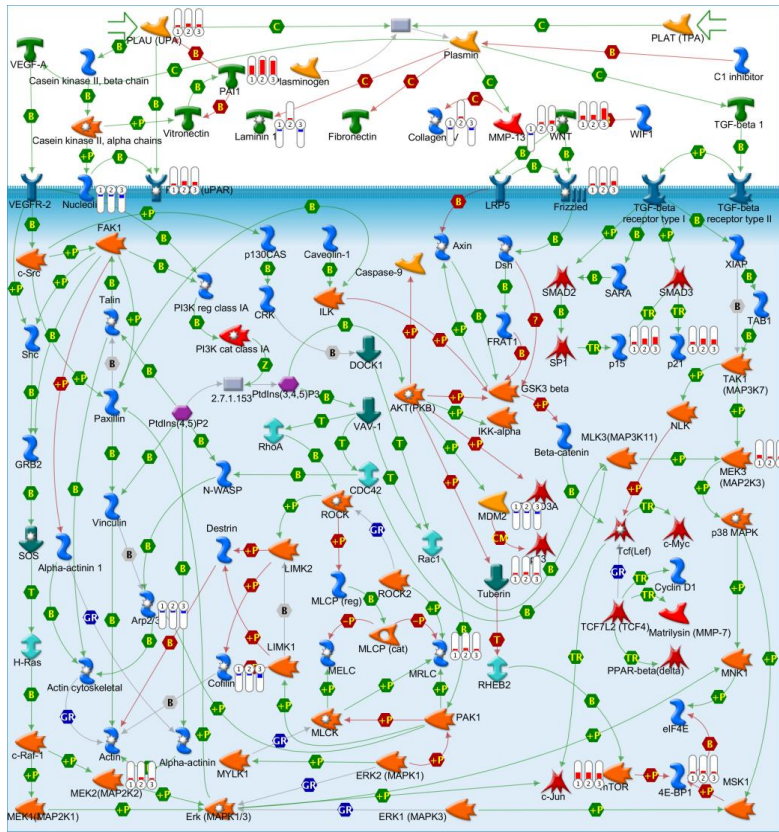


Regulación de TGFβ



Efecto de los inhibidores, EX547 y HR73, sobre la regulación de TGFβ

Figura 82. Los inhibidores de Sirt1, EX527 y HR73, afectan a la expresión de genes regulados por TGFβ que están involucrados en remodelación de matriz extracelular. Para ver detalles de figura, ver pie de figura 80.



Efecto de los inhibidores, EX547 y HR73, sobre la regulación de TGFβ

Figura 83. Los inhibidores de Sirt1, EX527 y HR73, afectan a la expresión de genes regulados por TGFβ que están involucrados en TGF, WNT y remodelación del citoesqueleto. Para ver detalles de figura, ver pie de figura 80.

V. CONCLUSIONS (CONCLUSIONES)

Having presented and discussed the results of this work, we can conclude the following:

1. In a search for new Smad2 interacting proteins by using the Cyto Trap Two-Hybrid System, we have found 110 different protein-representing clones. Within this group of interacting proteins, we mainly found novel Smad2 interacting proteins and some proteins whose interaction with Smad2 had been previously described.
2. A functional analysis performed with DAVID, on the set of genes found, showed that Smad2 Δ 93 is linked to several functional-related protein groups such as phosphoproteins, proteins involved in acetylation, stress response, host-virus interaction and mRNA processing and splicing.
3. Sirt1, a NAD⁺-dependent type III histone deacetylase, was found among the Smad2 interacting proteins. Sirt1 was selected to make a deeper study of its role in TGF β signalling related to Smad2.
4. Smad2 and Sirt1 interact *in vivo*, both in endogenous and overexpressed protein conditions. The interaction gets stronger when cells are stimulated with TGF β . The Sirt1/Smad2 interaction increases if Smad2 is acetylated. This interaction is also dependent on a catalytically active Sirt1.
5. Sirt1 is not involved in the deacetylation of Smad2 as its overexpression does not alter the acetylated status of Smad2.
6. *In vitro*, Smad2 and Sirt1 interact directly. We have determined by His-Pulldown assays that Smad2 MH1 domain and a portion of protein included between the L and MH2 domains are responsible for the interaction between these two proteins. On the other hand, Sirt1 interacts with Smad2 through a region of Sirt1 protein between amino acids 1 and 364.
7. Neither Sirt1 activation by resveratrol nor overexpression of Sirt1 significantly alters Smad4/Smad2 protein interaction or Smad2 phosphorylation. They neither cause the premature ending of either Smad2/Smad4 complex or Smad2 phosphorylation.

8. Sirt1 binds to Smad3 *in vivo* and *in vitro*. In HEK293T cells, this interaction is not dependent on TGFβ stimulation. The Sirt1 interaction with Smad3 is stronger than the interaction with Smad2, both *in vivo* and *in vitro*.
9. Upon TGFβ stimulation, Smad2 and Sirt1 colocalize in the nucleus in both HEK293T and HaCaT cells.
10. Sirt1 forms, in a TGFβ-dependent manner, a complex with Smad2, Smad3 and Smad4 that binds to TGFβ-dependent regulatory elements. Sirt1 binds either before or during the formation of the Smads/DNA complex. Sirt1 binding does not interfere with Smads binding to these regulatory elements.
11. In a DNA context, Sirt1 is able to interact with phospho-Smad2, phospho-Smad3 and Smad4, to bind to TGFβ-dependent specific promoters. Nevertheless, in the absence of DNA, the interaction between Sirt1/Smad4 and Sirt1/phospho-Smad2 are not propitious.
12. Sirt1 inhibits the transcriptional activity of TGFβ-dependent reporter genes and this inhibition relies on Sirt1 deacetylase activity.
13. Using RNA-Seq, we have shown that Sirt1 is involved in TGFβ-dependent transcription downregulation as well as transcription upregulation of a certain set of genes. We have validated, by qPCR, that Sirt1 is involved in the TGFβ transcription downregulation of a specific set of genes.
14. In our RNA-Seq experiment, we found that around 50% of TGFβ-dependent selected genes, whose transcription is altered by Sirt1 inhibition, exhibit an increment of Smad2 binding in their promoter/enhancer areas upon TGFβ stimulation. This is the first direct evidence of relationship between Sirt1 and Smad2 in TGFβ-dependent gene transcription regulation.
15. The Sirt1 effect on TGFβ-dependent gene transcription regulation is a long-lasting effect.
16. Sirt1 effect on TGFβ-dependent gene transcription regulation is a specific effect since Smad2 and Sirt1 only regulate transcription of a subset of TGFβ-dependent

genes. Thus, not all Smad2 TGF β -dependent genes exhibit a Sirt1-dependent transcription regulation.

17. All our data are consistent with a model by which some of the TGF β -dependent gene transcription downregulation could be driven by Sirt1-dependent mechanisms.

18. Finally, we can conclude that Sirt1 is only involved in some specific TGF β -regulated cell functions: development (EMT), immune response, cellular adhesion and cytoskeleton remodelling. Thus, Sirt1 participation on regulation of TGF β signalling is not a widespread phenomenon, but it is linked to the regulation of specific genes associated to specific cell processes.

VI. SUMMARY (RESUMEN)

VI.1. Introduction.

Transforming growth factor β (TGF β) belongs to a broad family of cytokines (1-3). It has been involved in a wide variety of biological processes such as cell proliferation and differentiation, embryonic development, wound healing, angiogenesis, extracellular matrix production and apoptosis (2, 4). The main mediators in TGF β signalling are the Smad proteins. The Smads are classified into three subgroups: receptor-regulated Smads or R-Smads (Smad1, Smad5, Smad8, Smad2 and Smad3), common-partner Smad or Co-Smad (Smad4) and inhibitory Smads or I-Smads (Smad6 and Smad7) (7). Smads have three well defined domains: Mad-homology 1 (MH1), Linker (L) y Mad-homology 2 (MH2) (5, 8, 10).

TGF β signalling is initiated by binding to and activating specific cell surface receptors that have intrinsic serine-threonine kinase activity. These activated TGF β receptors phosphorylate R-Smads proteins, which form complexes with Smad4 that accumulate in the nucleus and regulate, together with transcription factors, the transcription of a wide variety of genes (1, 2, 5, 19). It is difficult to justify the diversity of response that this cytokine is able to generate by the apparent simplicity of TGF β signalling pathway (134). It could be understood, partly, because the regulation of TGF β signalling is different depending on the cellular type, physiological state of the cell and ligand concentration (5). We can speculate that accessory Smad interacting proteins could be responsible for a fraction of the TGF β -dependent biological responses.

VI.2. Screening for new Smad2 interacting proteins.

The aim of this work was the search, identification, and characterization of new Smad2 interacting proteins. To that end, we used a method for detecting protein-protein interactions *in vivo*, the Cyto Trap Two-Hybrid System. This system allows us to study protein interactions that are difficult to pick up by other methods.

Additionally, this system allows working with proteins that are transcriptional activators like Smad2 (135).

For the new Smad2 interacting proteins screening, we used an expression library made from adult human lung, called pMyr-Librería(PH). As a bait protein, we used a protein construct of Smad2 that lacks the first 93 N-terminal amino acids called Smad2 Δ 93. In this screening we have found 110 different protein-representing clones that interact with Smad2 Δ 93. Within this group of proteins, we found proteins whose interaction with Smad2 had been previously described. This validates this method to detect Smad2 interacting proteins. Furthermore, we found proteins that interact with other Smads or proteins which expression is modified by TGF β signalling, as well as novel Smad2 interacting proteins (Section III.1).

We perform a functional analysis to the 110 Smad2 Δ 93 interacting proteins found in this screening. The analysis shows that Smad2 Δ 93 is linked to several functional-related protein groups such as phosphoproteins, proteins involved in acetylation, stress response, host-virus interaction, mRNA processing and splicing, heat shock proteins, etc. Sirt1, a NAD⁺-dependent type III histone deacetylase, was found in this screening (Section III.1). Sirt1 deacetylates histone (H1, H2 and H4) and non-histone proteins (78, 100, 102).

Smad2 is acetylated in response to TGF β and such acetylation is required for Smad2 transcriptional activation (54, 55). Smad3 is also acetylated in response to TGF β , which positively regulates its transcription activity (57). Smad7 is acetylated by p300, and TGF β cause its deacetylation and its consequent degradation (48). Sirt1 deacetylates both, Smad3 and Smad7 (50, 58). Up to this date, it's not known the protein involved in Smad2 deacetylation. Taken the acetylation of Smad2 into account, Sirt1 was selected, among the 110 interacting proteins, to study deeply its relation to Smad2 and its possible role in TGF β signalling. From this point on, this work was focus to unveil the implication of Sirt1 in TGF β signalling.

VI.3. Molecular and functional study of Smad2/Sirt1 interaction.

We study the interaction between Smad2 and Sirt1 by different methods to the Cyto Trap Two-Hybrid System. We have shown that Smad2 and Sirt1 interact *in vivo*, in HEK293T and Hep3B cells, both in endogenous and overexpressed protein conditions. The presence of TGF β increases Smad2/Sirt1 interaction (Section III.2). Moreover, by performing TSA experiments and experiments using Smad2 mutants in the lysine residues that are p300 acetylated in response to TGF β , we proved that Smad2/Sirt1 interaction is increased with the acetylation of Smad2 (Sections III.2 and III.4). Furthermore, using a catalytically inactive Sirt1 mutant, we showed that its interaction with Smad2 is dependent on a catalytically active Sirt1 protein, both before and after TGF β stimulation (Section III.4).

Smad2 is acetylated by p300 and PCAF in a TGF β -dependent manner (54, 55). The interaction between Smad2 and Sirt1 prompt us to think that Sirt1 could deacetylate Smad2. However, our experiments revealed that Sirt1 is not involved in the deacetylation of Smad2. Neither Sirt1 nor the catalytically inactive Sirt1 mutant (Sirt1H363Y) overexpression alters the acetylated status of Smad2 (Section III.3).

We further investigate Smad2/Sirt1 interaction. His-Pulldown analysis indicates that Smad2 and Sirt1 interact directly, *in vitro*. His-Pulldown assays also point out that MH1 domain and a portion of Smad2 protein between 173 and 468 amino acids (L and MH2 domain), and a region of Sirt1 protein between 1 and 364 amino acids (A and B fragments) are responsible for the interaction between these two proteins (Sections III.7 and III.8). Smad2 (our results) and Smad7 (50) bind Sirt1 through their MH1 domain. We found a high homology between a region of Smad2 (amino acids 47-170) and a region of Smad7 (amino acids 98-201). In both proteins, the homology area is near the lysine residues that are acetylated by p300 (Section IV.8).

We study whether Sirt1 activation by resveratrol or Sirt1 overexpression has any effect over Smad4/Smad2 interaction or Smad2 phosphorylated state. Our results show that neither Sirt1 activation nor Sirt1 overexpression alters significantly

Smad4/Smad2 interaction or Smad2 phosphorylation. They neither make a premature ending of Smad2/Smad4 complex or Smad2 phosphorylation (Section III.5).

We also study the interaction between Sirt1 and Smad3. We found that Sirt1 binds to Smad3 both, *in vivo* and *in vitro*. In HEK293T cells, this interaction is not dependent of TGF β stimulation. Moreover, Sirt1 interaction with Smad3 is more robust than the interaction with Smad2, both *in vivo* and *in vitro* (Section III.6).

Protein subcellular localization is a very important mechanism for protein function. Smads nucleocytoplasmic shuttling is crucial for transduction of TGF β signal from receptor into the nucleus (22). Sirt1, typically, has a nuclear localization but it could vary in different situations (26). We studied the subcellular localization of Smad2 and Sirt1 in response to TGF β signalling. The results show that Smad2 and Sirt1, upon TGF β stimulation, colocalize in the nucleus in both, HEK293T and HaCaT cells, which strongly suggests that Sirt1 could be involved in TGF β -dependent transcription together with Smad2 (Section III.10).

Considering the nuclear colocalization of Smad2 and Sirt1, we study whether Sirt1 forms a complex with Smads at specific TGF β -inducible gene promoters. We show, by DNA-Pulldown assays, that Sirt1 is included, when cells are stimulated with TGF β , in a complex with Smad2, Smad3 and Smad4, to bind to TGF β -dependent regulatory elements: *c-jun* SBR (163, 202) and DE (66, 68, 155). Moreover, Sirt1 binds either before or during the formation of the Smads/DNA complex. To some extent, Sirt1 binds independently of Smads to DNA, although it is in need of additional proteins. So we propose that once Smads have bound to DNA, Sirt1 binding relocates to Smads specific DNA binding sequences. Furthermore, Sirt1 binding does not perturb Smads binding to these regulatory elements (Section III.11).

By DNA-Pulldown assays, we have found that Smad4 and phospho-Smad2 or phospho-Smad3 form a complex with Sirt1 (Section III.11). We have also found, *in vitro*, that Sirt1 not only interacts with phospho-Smad2 but also that Sirt1/Smad2 interaction is favoured by Smad2 phosphorylation (Section III.9). However, in total protein extract, Sirt1 neither binds to phospho-Smad2 nor form a trimeric complex with

Smad4/phospho-Smad2 (Section III.5). We conclude that, in a DNA context, Sirt1 is able to interact with phospho-Smad2, phospho-Smad3 and Smad4, to bind to DNA to specific TGF β -dependent promoters. We can speculate that, once bound to DNA, phospho-Smad2/Smad4 complex undergoes a conformational change that allows its binding to Sirt1. Nevertheless, in the absence of DNA, the interaction between Sirt1/Smad4 is not propitious and Sirt1/phospho-Smad2 interaction could be competed by Smad4 or other proteins, so we are not able to detect them. We cannot rule out the co-existence of different DNA complexes: Sirt1/Smad4/phospho-Smad2, Smad4/phospho-Smad2, Sirt1/phospho-Smad2, and Sirt1/Smad2, which may regulate transcription at different genes.

Taking into account that Sirt1 binds to TGF β gene promoters, we studied whether Sirt1 was capable of modifying TGF β -dependent transcription. We prove that Sirt1 overexpression partially inhibits transcriptional activity of two TGF β -dependent luciferase reporter genes: ARE-Luc and DE-Luc, and this inhibition is Sirt1 deacetylase activity dependent. Furthermore, Sirt1 interference, by two different siRNAs, increases transcriptional activity of DE-Luc reporter gene. So, we can conclude that Sirt1 is involved in DE-Luc and ARE-Luc inhibition of transcription (Section III.11).

VI.4. Sirt1 implications in TGF β -dependent transcription.

The Smads recruit coactivators or corepressors to modify chromatin state and regulate TGF β -dependent transcription (63). In particular, to repress TGF β -dependent transcription, among other mechanisms, Smads recruit HDACs to gene promoters to make a more restrictive chromatin (63). Sirt1 is a HDAC that regulate transcription by heterochromatin formation and deacetylation of co-regulators and co-factors (71, 78, 102, 120).

To assess the role of Sirt1 in TGF β -dependent transcription, we performed an RNA-Seq experiment. TGF β -dependent transcription of a control sample and samples treated with EX527 (56, 72) or HR73 (72, 209) (both Sirt1 inhibitors) was compared. RNA-Seq experiment data shows that Sirt1 mediates TGF β -dependent transcription

downregulation of certain genes as well as TGFβ-dependent transcription upregulation of a different set of genes (Section III.12).

In the RNA-Seq experiment, we found that around 50% of TGFβ-dependent selected genes, whose transcription is altered by Sirt1 inhibition, exhibit an increment of Smad2 binding in their promoter/enhancer areas (H3K4me3, H3K4me1 and DNase I hypersensitivity) upon TGFβ stimulation. That strongly suggests that Sirt1 together with Smad2 are involved in the TGFβ-dependent transcription of those genes and provides the first direct evidence of involvement of Sirt1 and Smad2 proteins together in TGFβ-dependent gene transcription regulation (Section III.12). Smad2 and Smad3 have different roles in TGFβ signalling as they take part in different gene-set regulations (230). Furthermore, Smad3 is acetylated in response to TGFβ (54, 57) and Sirt1 is involved in its deacetylation (58). Thus, the remaining RNA-Seq experiment selected genes could be Smad3 regulated genes. We cannot rule out that they could also be regulated by non canonical TGFβ pathways having Sirt1 a role in their regulation.

Our analysis of RNA-Seq experiment reveals also that Sirt1 effect on TGFβ-dependent gene transcription regulation is a long-lasting effect. The role of Sirt1 was studied in genes which promoters/enhancers exhibit Smad2 binding in response to TGFβ. On the other hand, Sirt1 effect on TGFβ-regulated genes is not a general effect: Smad2 and Sirt1 regulate transcription of only a sub-set of TGFβ-dependent genes. We can conclude that not all Smad2-dependent genes are transcriptionally regulated by Sirt1. Finally, we could validate, by qPCR, that Sirt1 is involved in TGFβ-dependent transcription downregulation of a specific set of genes (Section III.12). In a coming future we want to study deeply the molecular aspects of Sirt1 involvement in the TGFβ-dependent gene transcription upregulation.

Finally, to study the TGFβ cellular functions in which Sirt1 is involved, we made a functional analysis to the TGFβ-dependent genes that are modified by Sirt1 inhibitors (RNA-Seq gene pool). This analysis shows that Sirt1 is only involved in some specific TGFβ-regulated networks that are related to distinct cellular functions, such as development (EMT), immune response, cellular adhesion and cytoskeleton

remodelling (Section IV.14). Thus, we can conclude that Sirt1 involvement on TGF β -dependent transcription regulation is not a widespread phenomenon, but it is linked to the regulation of set of genes associated to specific cell processes.

In conclusion, we have proven that Sirt1 inhibition blocks TGF β gene transcription downregulation (Section III.12). Thus, our data point out towards Sirt1 being a protein involved in TGF β -dependent transcription downregulation for a specific set of genes. We suggest a model by which Smad2 is phosphorylated and acetylated in response to TGF β . Once in the nucleus, Smad2 is enrolled in TGF β transcription downregulation of an important number of genes. That could be done via a Sirt1-dependent mechanism in which Smad2 recruits Sirt1 to gene promoters to downregulate TGF β -dependent gene transcription by deacetylation of histones, histone acetyl transferases (HAT) or transcription factors involved in transcription regulation of these genes. Additional regulation may come from Sirt1-independent mechanisms. Furthermore, TGF β transcription downregulation of other group of genes could be driven by Smad3. Similarly to Smad2, the mechanism could be both Sirt1 dependent and independent. Additionally, the regulation of the four TGF β -dependent functions, EMT, immune response, cellular adhesion and cytoskeleton remodelling, closely related to cancer progression (3, 8, 77), is a new useful piece of data that might be use for a future research of new therapeutic targets against cancer.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 2003 Jun 13;113(6):685-700.
2. ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci*. 2004 May;29(5):265-73.
3. Bierie B, Moses HL. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006 Jul;6(7):506-20.
4. Blobel GA, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med*. 2000 May 4;342(18):1350-8.
5. Ross S, Hill CS. How the Smads regulate transcription. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(3):383-408.
6. Schmierer B, Hill CS. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Dec;8(12):970-82.
7. Samanta D, Datta PK. Alterations in the Smad pathway in human cancers. *Front Biosci*. 2012;17:1281-93.
8. Heldin CH, Moustakas A. Role of Smads in TGFbeta signaling. *Cell Tissue Res*. 2012 Jan;347(1):21-36.
9. Yan X, Chen YG. Smad7: not only a regulator, but also a cross-talk mediator of TGF-beta signalling. *Biochem J*. 2011 Feb 15;434(1):1-10.
10. Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev*. 2005 Dec 1;19(23):2783-810.
11. Dennler S, Huet S, Gauthier JM. A short amino-acid sequence in MH1 domain is responsible for functional differences between Smad2 and Smad3. *Oncogene*. 1999 Feb 25;18(8):1643-8.
12. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci*. 2003 Jan 15;116(Pt 2):217-24.
13. de Caestecker M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004 Feb;15(1):1-11.
14. Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, Wrana JL. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell*. 1998 Dec 11;95(6):779-91.
15. Tang WB, Ling GH, Sun L, Liu FY. Smad anchor for receptor activation (SARA) in TGF-beta signaling. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2010;2:857-60.
16. Lin HK, Bergmann S, Pandolfi PP. Cytoplasmic PML function in TGF-beta signalling. *Nature*. 2004 Sep 9;431(7005):205-11.

17. Hocevar BA, Smine A, Xu XX, Howe PH. The adaptor molecule Disabled-2 links the transforming growth factor beta receptors to the Smad pathway. *EMBO J.* 2001 Jun 1;20(11):2789-801.
18. Wu JW, Fairman R, Penry J, Shi Y. Formation of a stable heterodimer between Smad2 and Smad4. *J Biol Chem.* 2001 Jun 8;276(23):20688-94.
19. Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:659-93.
20. Nicolas FJ, De Bosscher K, Schmierer B, Hill CS. Analysis of Smad nucleocytoplasmic shuttling in living cells. *J Cell Sci.* 2004 Aug 15;117(Pt 18):4113-25.
21. Pierreux CE, Nicolas FJ, Hill CS. Transforming growth factor beta-independent shuttling of Smad4 between the cytoplasm and nucleus. *Mol Cell Biol.* 2000 Dec;20(23):9041-54.
22. Hill CS. Nucleocytoplasmic shuttling of Smad proteins. *Cell Res.* 2009 Jan;19(1):36-46.
23. Inman GJ, Nicolas FJ, Hill CS. Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF-beta receptor activity. *Mol Cell.* 2002 Aug;10(2):283-94.
24. Lin X, Duan X, Liang YY, Su Y, Wrighton KH, Long J, et al. PPM1A functions as a Smad phosphatase to terminate TGFbeta signaling. *Cell.* 2006 Jun 2;125(5):915-28.
25. Hetzer MW, Walther TC, Mattaj IW. Pushing the envelope: structure, function, and dynamics of the nuclear periphery. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:347-80.
26. Tanno M, Sakamoto J, Miura T, Shimamoto K, Horio Y. Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. *J Biol Chem.* 2007 Mar 2;282(9):6823-32.
27. Tajima Y, Goto K, Yoshida M, Shinomiya K, Sekimoto T, Yoneda Y, et al. Chromosomal region maintenance 1 (CRM1)-dependent nuclear export of Smad ubiquitin regulatory factor 1 (Smurf1) is essential for negative regulation of transforming growth factor-beta signaling by Smad7. *J Biol Chem.* 2003 Mar 21;278(12):10716-21.
28. Moustakas A, Heldin CH. Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci.* 2005 Aug 15;118(Pt 16):3573-84.
29. Moustakas A, Heldin CH. The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development.* 2009 Nov;136(22):3699-714.
30. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature.* 2003 Oct 9;425(6958):577-84.
31. Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, Chiba T, Tanaka K, Imamura T, et al. Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem.* 2001 Apr 20;276(16):12477-80.

-
32. Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, et al. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell*. 2000 Dec;6(6):1365-75.
 33. Xu P, Liu J, Derynck R. Post-translational regulation of TGF-beta receptor and Smad signaling. *FEBS Lett*. 2012 Jul 4;586(14):1871-84.
 34. Valdimarsdottir G, Goumans MJ, Itoh F, Itoh S, Heldin CH, ten Dijke P. Smad7 and protein phosphatase 1alpha are critical determinants in the duration of TGF-beta/ALK1 signaling in endothelial cells. *BMC Cell Biol*. 2006;7:16.
 35. Zhang S, Fei T, Zhang L, Zhang R, Chen F, Ning Y, et al. Smad7 antagonizes transforming growth factor beta signaling in the nucleus by interfering with functional Smad-DNA complex formation. *Mol Cell Biol*. 2007 Jun;27(12):4488-99.
 36. Stopa M, Anhof D, Terstegen L, Gatsios P, Gressner AM, Dooley S. Participation of Smad2, Smad3, and Smad4 in transforming growth factor beta (TGF-beta)-induced activation of Smad7. THE TGF-beta response element of the promoter requires functional Smad binding element and E-box sequences for transcriptional regulation. *J Biol Chem*. 2000 Sep 22;275(38):29308-17.
 37. Watanabe Y, Itoh S, Goto T, Ohnishi E, Inamitsu M, Itoh F, et al. TMEMPAI, a transmembrane TGF-beta-inducible protein, sequesters Smad proteins from active participation in TGF-beta signaling. *Mol Cell*. 2010 Jan 15;37(1):123-34.
 38. Chen YG, Liu F, Massague J. Mechanism of TGFbeta receptor inhibition by FKBP12. *EMBO J*. 1997 Jul 1;16(13):3866-76.
 39. Pan D, Estevez-Salmeron LD, Stroschein SL, Zhu X, He J, Zhou S, et al. The integral inner nuclear membrane protein MAN1 physically interacts with the R-Smad proteins to repress signaling by the transforming growth factor-{beta} superfamily of cytokines. *J Biol Chem*. 2005 Apr 22;280(16):15992-6001.
 40. Feng XH, Derynck R. A kinase subdomain of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor determines the TGF-beta intracellular signaling specificity. *EMBO J*. 1997 Jul 1;16(13):3912-23.
 41. Abdollah S, Macias-Silva M, Tsukazaki T, Hayashi H, Attisano L, Wrana JL. TbetaRI phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling. *J Biol Chem*. 1997 Oct 31;272(44):27678-85.
 42. Souchelnytskyi S, Tamaki K, Engstrom U, Wernstedt C, ten Dijke P, Heldin CH. Phosphorylation of Ser465 and Ser467 in the C terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem*. 1997 Oct 31;272(44):28107-15.
 43. Liu X, Sun Y, Constantinescu SN, Karam E, Weinberg RA, Lodish HF. Transforming growth factor beta-induced phosphorylation of Smad3 is required for growth inhibition and transcriptional induction in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Sep 30;94(20):10669-74.
-

44. Chacko BM, Qin BY, Tiwari A, Shi G, Lam S, Hayward LJ, et al. Structural basis of heteromeric smad protein assembly in TGF-beta signaling. *Mol Cell*. 2004 Sep 10;15(5):813-23.
45. Sapkota G, Knockaert M, Alarcon C, Montalvo E, Brivanlou AH, Massague J. Dephosphorylation of the linker regions of Smad1 and Smad2/3 by small C-terminal domain phosphatases has distinct outcomes for bone morphogenetic protein and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem*. 2006 Dec 29;281(52):40412-9.
46. Thiagalingam S, Cheng KH, Lee HJ, Mineva N, Thiagalingam A, Ponte JF. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Mar;983:84-100.
47. Gregoretta IV, Lee YM, Goodson HV. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol*. 2004 Apr 16;338(1):17-31.
48. Gronroos E, Hellman U, Heldin CH, Ericsson J. Control of Smad7 stability by competition between acetylation and ubiquitination. *Mol Cell*. 2002 Sep;10(3):483-93.
49. Simonsson M, Heldin CH, Ericsson J, Gronroos E. The balance between acetylation and deacetylation controls Smad7 stability. *J Biol Chem*. 2005 Jun 10;280(23):21797-803.
50. Kume S, Haneda M, Kanasaki K, Sugimoto T, Araki S, Isshiki K, et al. SIRT1 inhibits transforming growth factor beta-induced apoptosis in glomerular mesangial cells via Smad7 deacetylation. *J Biol Chem*. 2007 Jan 5;282(1):151-8.
51. Pouponnot C, Jayaraman L, Massague J. Physical and functional interaction of SMADs and p300/CBP. *J Biol Chem*. 1998 Sep 4;273(36):22865-8.
52. Nishihara A, Hanai JI, Okamoto N, Yanagisawa J, Kato S, Miyazono K, et al. Role of p300, a transcriptional coactivator, in signalling of TGF-beta. *Genes Cells*. 1998 Sep;3(9):613-23.
53. Ross S, Cheung E, Petrakis TG, Howell M, Kraus WL, Hill CS. Smads orchestrate specific histone modifications and chromatin remodeling to activate transcription. *EMBO J*. 2006 Oct 4;25(19):4490-502.
54. Simonsson M, Kanduri M, Gronroos E, Heldin CH, Ericsson J. The DNA binding activities of Smad2 and Smad3 are regulated by coactivator-mediated acetylation. *J Biol Chem*. 2006 Dec 29;281(52):39870-80.
55. Tu AW, Luo K. Acetylation of Smad2 by the co-activator p300 regulates activin and transforming growth factor beta response. *J Biol Chem*. 2007 Jul 20;282(29):21187-96.
56. Solomon JM, Pasupuleti R, Xu L, McDonagh T, Curtis R, DiStefano PS, et al. Inhibition of SIRT1 catalytic activity increases p53 acetylation but does not alter cell survival following DNA damage. *Mol Cell Biol*. 2006 Jan;26(1):28-38.

-
57. Inoue Y, Itoh Y, Abe K, Okamoto T, Daitoku H, Fukamizu A, et al. Smad3 is acetylated by p300/CBP to regulate its transactivation activity. *Oncogene*. 2007 Jan 25;26(4):500-8.
 58. Li J, Qu X, Ricardo SD, Bertram JF, Nikolic-Paterson DJ. Resveratrol inhibits renal fibrosis in the obstructed kidney: potential role in deacetylation of Smad3. *Am J Pathol*. 2010 Sep;177(3):1065-71.
 59. Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*. 2001;70:503-33.
 60. Inoue Y, Imamura T. Regulation of TGF-beta family signaling by E3 ubiquitin ligases. *Cancer Sci*. 2008 Nov;99(11):2107-12.
 61. Izzi L, Attisano L. Regulation of the TGFbeta signalling pathway by ubiquitin-mediated degradation. *Oncogene*. 2004 Mar 15;23(11):2071-8.
 62. Levy L, Hill CS. Smad4 dependency defines two classes of transforming growth factor {beta} (TGF-{beta}) target genes and distinguishes TGF-{beta}-induced epithelial-mesenchymal transition from its antiproliferative and migratory responses. *Mol Cell Biol*. 2005 Sep;25(18):8108-25.
 63. Derynck R, Miyazono K. The TGF-[beta] family. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2007.
 64. Chen X, Rubock MJ, Whitman M. A transcriptional partner for MAD proteins in TGF-beta signalling. *Nature*. 1996 Oct 24;383(6602):691-6.
 65. Chen X, Weisberg E, Fridmacher V, Watanabe M, Naco G, Whitman M. Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor. *Nature*. 1997 Sep 4;389(6646):85-9.
 66. Germain S, Howell M, Esslemont GM, Hill CS. Homeodomain and winged-helix transcription factors recruit activated Smads to distinct promoter elements via a common Smad interaction motif. *Genes Dev*. 2000 Feb 15;14(4):435-51.
 67. Randall RA, Howell M, Page CS, Daly A, Bates PA, Hill CS. Recognition of phosphorylated-Smad2-containing complexes by a novel Smad interaction motif. *Mol Cell Biol*. 2004 Feb;24(3):1106-21.
 68. Watabe T, Kim S, Candia A, Rothbacher U, Hashimoto C, Inoue K, et al. Molecular mechanisms of Spemann's organizer formation: conserved growth factor synergy between *Xenopus* and mouse. *Genes Dev*. 1995 Dec 15;9(24):3038-50.
 69. Jiang C, Pugh BF. Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nat Rev Genet*. 2009 Mar;10(3):161-72.
 70. Seitz S. Connecting the histone acetyltransferase complex SAS-I to the centromere in *S. cerevisiae*. 2005 [cited 2012]; Available from: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/seitz-stefanie-2004-10-20/HTML/chapter1.html>.
-

71. Vaquero A, Sternglanz R, Reinberg D. NAD⁺-dependent deacetylation of H4 lysine 16 by class III HDACs. *Oncogene*. 2007 Aug 13;26(37):5505-20.
72. Lawson M, Uciechowska U, Schemies J, Rumpf T, Jung M, Sippl W. Inhibitors to understand molecular mechanisms of NAD(+)-dependent deacetylases (sirtuins). *Biochim Biophys Acta*. 2010 Oct-Dec;1799(10-12):726-39.
73. de Caestecker MP, Yahata T, Wang D, Parks WT, Huang S, Hill CS, et al. The Smad4 activation domain (SAD) is a proline-rich, p300-dependent transcriptional activation domain. *J Biol Chem*. 2000 Jan 21;275(3):2115-22.
74. Wang G, Long J, Matsuura I, He D, Liu F. The Smad3 linker region contains a transcriptional activation domain. *Biochem J*. 2005 Feb 15;386(Pt 1):29-34.
75. Kang JS, Alliston T, Delston R, Derynck R. Repression of Runx2 function by TGF-beta through recruitment of class II histone deacetylases by Smad3. *EMBO J*. 2005 Jul 20;24(14):2543-55.
76. Agricola E, Randall RA, Gaarenstroom T, Dupont S, Hill CS. Recruitment of TIF1gamma to chromatin via its PHD finger-bromodomain activates its ubiquitin ligase and transcriptional repressor activities. *Mol Cell*. 2011 Jul 8;43(1):85-96.
77. Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003 Nov;3(11):807-21.
78. Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J*. 2007 May 15;404(1):1-13.
79. Yamamoto H, Schoonjans K, Auwerx J. Sirtuin functions in health and disease. *Mol Endocrinol*. 2007 Aug;21(8):1745-55.
80. Brachmann CB, Sherman JM, Devine SE, Cameron EE, Pillus L, Boeke JD. The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes Dev*. 1995 Dec 1;9(23):2888-902.
81. Frye RA. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Jul 5;273(2):793-8.
82. Guarente L. Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. *Genes Dev*. 2000 May 1;14(9):1021-6.
83. Shore D, Squire M, Nasmyth KA. Characterization of two genes required for the position-effect control of yeast mating-type genes. *EMBO J*. 1984 Dec 1;3(12):2817-23.
84. Sun Y, Sun D, Li F, Tian L, Li C, Li L, et al. Downregulation of Sirt1 by antisense oligonucleotides induces apoptosis and enhances radiation sensitization in A549 lung cancer cells. *Lung Cancer*. 2007 Oct;58(1):21-9.
85. Haigis MC, Guarente LP. Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev*. 2006 Nov 1;20(21):2913-21.

-
86. Lavu S, Boss O, Elliott PJ, Lambert PD. Sirtuins--novel therapeutic targets to treat age-associated diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2008 Oct;7(10):841-53.
87. Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC, Horikawa I. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell.* 2005 Oct;16(10):4623-35.
88. Scher MB, Vaquero A, Reinberg D. SirT3 is a nuclear NAD⁺-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress. *Genes Dev.* 2007 Apr 15;21(8):920-8.
89. Haigis MC, Sinclair DA. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol.* 2010;5:253-95.
90. Stunkel W, Campbell RM. Sirtuin 1 (SIRT1): the misunderstood HDAC. *J Biomol Screen.* 2011 Dec;16(10):1153-69.
91. Tsai YC, Greco TM, Boonmee A, Miteva Y, Cristea IM. Functional proteomics establishes the interaction of SIRT7 with chromatin remodeling complexes and expands its role in regulation of RNA polymerase I transcription. *Mol Cell Proteomics.* 2012 Feb;11(2):M111 015156.
92. Kwon HS, Ott M. The ups and downs of SIRT1. *Trends Biochem Sci.* 2008 Nov;33(11):517-25.
93. Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, et al. Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science.* 2004 Jul 16;305(5682):390-2.
94. Bordone L, Cohen D, Robinson A, Motta MC, van Veen E, Czapik A, et al. SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging Cell.* 2007 Dec;6(6):759-67.
95. Hu Y, Liu J, Wang J, Liu Q. The controversial links among calorie restriction, SIRT1, and resveratrol. *Free Radic Biol Med.* 2011 Jul 15;51(2):250-6.
96. Li Y, Xu W, McBurney MW, Longo VD. SirT1 inhibition reduces IGF-I/IRS-2/Ras/ERK1/2 signaling and protects neurons. *Cell Metab.* 2008 Jul;8(1):38-48.
97. Chen D, Steele AD, Lindquist S, Guarente L. Increase in activity during calorie restriction requires Sirt1. *Science.* 2005 Dec 9;310(5754):1641.
98. Palacios JA, Herranz D, De Bonis ML, Velasco S, Serrano M, Blasco MA. SIRT1 contributes to telomere maintenance and augments global homologous recombination. *J Cell Biol.* 2010 Dec 27;191(7):1299-313.
99. Maiese K, Chong ZZ, Shang YC, Wang S. Translating cell survival and cell longevity into treatment strategies with SIRT1. *Rom J Morphol Embryol.* 2011;52(4):1173-85.
-

100. Rajendran R, Garva R, Krstic-Demonacos M, Demonacos C. Sirtuins: molecular traffic lights in the crossroad of oxidative stress, chromatin remodeling, and transcription. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:368276.
101. Deng CX. SIRT1, is it a tumor promoter or tumor suppressor? *Int J Biol Sci.* 2009;5(2):147-52.
102. Vaquero A, Scher M, Lee D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol Cell.* 2004 Oct 8;16(1):93-105.
103. Fulco M, Schiltz RL, Iezzi S, King MT, Zhao P, Kashiwaya Y, et al. Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. *Mol Cell.* 2003 Jul;12(1):51-62.
104. Kong S, Kim SJ, Sandal B, Lee SM, Gao B, Zhang DD, et al. The type III histone deacetylase Sirt1 protein suppresses p300-mediated histone H3 lysine 56 acetylation at Bclaf1 promoter to inhibit T cell activation. *J Biol Chem.* 2011 May 13;286(19):16967-75.
105. Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, et al. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell.* 2001 Oct 19;107(2):149-59.
106. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, et al. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell.* 2001 Oct 19;107(2):137-48.
107. Stunkel W, Peh BK, Tan YC, Nayagam VM, Wang X, Salto-Tellez M, et al. Function of the SIRT1 protein deacetylase in cancer. *Biotechnol J.* 2007 Nov;2(11):1360-8.
108. Zschoernig B, Mahlknecht U. SIRTUIN 1: regulating the regulator. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Nov 14;376(2):251-5.
109. Sasaki T, Maier B, Kodlega KD, Chruszcz M, Gluba W, Stukenberg PT, et al. Phosphorylation regulates SIRT1 function. *PLoS One.* 2008;3(12):e4020.
110. Zschoernig B, Mahlknecht U. Carboxy-terminal phosphorylation of SIRT1 by protein kinase CK2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Apr 10;381(3):372-7.
111. Ford J, Ahmed S, Allison S, Jiang M, Milner J. JNK2-dependent regulation of SIRT1 protein stability. *Cell Cycle.* 2008 Oct;7(19):3091-7.
112. Nasrin N, Kaushik VK, Fortier E, Wall D, Pearson KJ, de Cabo R, et al. JNK1 phosphorylates SIRT1 and promotes its enzymatic activity. *PLoS One.* 2009;4(12):e8414.
113. Kim EJ, Kho JH, Kang MR, Um SJ. Active regulator of SIRT1 cooperates with SIRT1 and facilitates suppression of p53 activity. *Mol Cell.* 2007 Oct 26;28(2):277-90.
114. Kim JE, Chen J, Lou Z. DBC1 is a negative regulator of SIRT1. *Nature.* 2008 Jan 31;451(7178):583-6.

-
115. Zhao W, Kruse JP, Tang Y, Jung SY, Qin J, Gu W. Negative regulation of the deacetylase SIRT1 by DBC1. *Nature*. 2008 Jan 31;451(7178):587-90.
116. Oberdoerffer P, Sinclair DA. The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Sep;8(9):692-702.
117. Bi X. Functions of chromatin remodeling factors in heterochromatin formation and maintenance. *Sci China Life Sci*. 2012 Jan;55(1):89-96.
118. Shahbazian MD, Grunstein M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:75-100.
119. Delcuve GP, Rastegar M, Davie JR. Epigenetic control. *J Cell Physiol*. 2009 May;219(2):243-50.
120. Zhang T, Kraus WL. SIRT1-dependent regulation of chromatin and transcription: linking NAD(+) metabolism and signaling to the control of cellular functions. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Aug;1804(8):1666-75.
121. Murayama A, Ohmori K, Fujimura A, Minami H, Yasuzawa-Tanaka K, Kuroda T, et al. Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status. *Cell*. 2008 May 16;133(4):627-39.
122. Wang RH, Sengupta K, Li C, Kim HS, Cao L, Xiao C, et al. Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. *Cancer Cell*. 2008 Oct 7;14(4):312-23.
123. Vaquero A, Scher M, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Serrano L, Reinberg D. SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation. *Nature*. 2007 Nov 15;450(7168):440-4.
124. O'Hagan HM, Mohammad HP, Baylin SB. Double strand breaks can initiate gene silencing and SIRT1-dependent onset of DNA methylation in an exogenous promoter CpG island. *PLoS Genet*. 2008;4(8):e1000155.
125. Bouras T, Fu M, Sauve AA, Wang F, Quong AA, Perkins ND, et al. SIRT1 deacetylation and repression of p300 involves lysine residues 1020/1024 within the cell cycle regulatory domain 1. *J Biol Chem*. 2005 Mar 18;280(11):10264-76.
126. Zhao X, Sternsdorf T, Bolger TA, Evans RM, Yao TP. Regulation of MEF2 by histone deacetylase 4- and SIRT1 deacetylase-mediated lysine modifications. *Mol Cell Biol*. 2005 Oct;25(19):8456-64.
127. Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, et al. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature*. 2004 Jun 17;429(6993):771-6.
128. Liu T, Liu PY, Marshall GM. The critical role of the class III histone deacetylase SIRT1 in cancer. *Cancer Res*. 2009 Mar 1;69(5):1702-5.
-

129. Donmez G, Guarente L. Aging and disease: connections to sirtuins. *Aging Cell*. 2010 Apr;9(2):285-90.
130. Pruitt K, Zinn RL, Ohm JE, McGarvey KM, Kang SH, Watkins DN, et al. Inhibition of SIRT1 reactivates silenced cancer genes without loss of promoter DNA hypermethylation. *PLoS Genet*. 2006 Mar;2(3):e40.
131. Chen J, Zhang B, Wong N, Lo AW, To KF, Chan AW, et al. Sirtuin 1 is upregulated in a subset of hepatocellular carcinomas where it is essential for telomere maintenance and tumor cell growth. *Cancer Res*. 2011 Jun 15;71(12):4138-49.
132. Byles V, Zhu L, Lovaas JD, Chmielewski LK, Wang J, Faller DV, et al. SIRT1 induces EMT by cooperating with EMT transcription factors and enhances prostate cancer cell migration and metastasis. *Oncogene*. 2012 Oct 25;31(43):4619-29.
133. Yuan J, Minter-Dykhouse K, Lou Z. A c-Myc-SIRT1 feedback loop regulates cell growth and transformation. *J Cell Biol*. 2009 Apr 20;185(2):203-11.
134. Roberts AB. The ever-increasing complexity of TGF-beta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002 Feb;13(1):3-5.
135. Stratagene. CytoTrap XR Premade Libraries. Instruction Manual.:1-50.
136. Fields S, Sternglanz R. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet*. 1994 Aug;10(8):286-92.
137. Allen JB, Walberg MW, Edwards MC, Elledge SJ. Finding prospective partners in the library: the two-hybrid system and phage display find a match. *Trends Biochem Sci*. 1995 Dec;20(12):511-6.
138. Petitjean A, Hilger F, Tatchell K. Comparison of thermosensitive alleles of the CDC25 gene involved in the cAMP metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1990 Apr;124(4):797-806.
139. Quilliam LA, Khosravi-Far R, Huff SY, Der CJ. Guanine nucleotide exchange factors: activators of the Ras superfamily of proteins. *Bioessays*. 1995 May;17(5):395-404.
140. Schwarzer C, Barnikol-Watanabe S, Thinnes FP, Hilschmann N. Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) interacts with the dynein light chain Tctex1 and the heat-shock protein PBP74. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002 Sep;34(9):1059-70.
141. Chattopadhyay S, Roberts PM, Pearce DA. The yeast model for Batten disease: a role for Btn2p in the trafficking of the Golgi-associated vesicular targeting protein, Yif1p. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Mar 14;302(3):534-8.
142. Wang X, Yang Y, Guo X, Sampson ER, Hsu CL, Tsai MY, et al. Suppression of androgen receptor transactivation by Pyk2 via interaction and phosphorylation of the ARA55 coregulator. *J Biol Chem*. 2002 May 3;277(18):15426-31.

-
143. Hu Y, Mivechi NF. HSF-1 interacts with Ral-binding protein 1 in a stress-responsive, multiprotein complex with HSP90 in vivo. *J Biol Chem.* 2003 May 9;278(19):17299-306.
144. Pearson WR, Lipman DJ. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Apr;85(8):2444-8.
145. PANDA group EBI. EMBL Nucleotide Sequence Database. Cambridge [cited 2006-2008]; Available from: <http://www.ebi.ac.uk/embl/>.
146. Hoffmann R, Valencia A. A gene network for navigating the literature. *Nat Genet.* 2004 Jul;36(7):664.
147. Hoffmann R. IHOP (Information Hiperlink Over Proteins). [2006-2008]; Available from: <http://www.ihop-net.org>.
148. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;4(1):44-57.
149. Hill CS, Wynne J, Treisman R. The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell.* 1995 Jun 30;81(7):1159-70.
150. Mizushima S, Nagata S. pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res.* 1990 Sep 11;18(17):5322.
151. van de Wetering M, Oving I, Muncan V, Pon Fong MT, Brantjes H, van Leenen D, et al. Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO Rep.* 2003 Jun;4(6):609-15.
152. Ambión. Using siRNA for gene silencing is a rapidly evolving tool in molecular biology. [cited 2008]; Available from: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Ambion-Tech-Support/rnai-sirna/general-articles/-sirna-design-guidelines.html>.
153. LAB T. The siRNA user guide [cited 2008]; Available from: <http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html>.
154. Ambión. siRNA Target Finder. [cited 2008]; Available from: http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html.
155. Candia AF, Watabe T, Hawley SH, Onichtchouk D, Zhang Y, Derynck R, et al. Cellular interpretation of multiple TGF-beta signals: intracellular antagonism between activin/BVg1 and BMP-2/4 signaling mediated by Smads. *Development.* 1997 Nov;124(22):4467-80.
156. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.* 1988 Mar;106(3):761-71.
157. Perez Oliva AB, Fernandez LP, Detorre C, Herraiz C, Martinez-Escribano JA, Benitez J, et al. Identification and functional analysis of novel variants of the human
-

melanocortin 1 receptor found in melanoma patients. *Hum Mutat.* 2009 May;30(5):811-22.

158. Sambrook J, Russell DW. The condensed protocols from Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2006.

159. Sambrook J, Russell DW. The condensed protocols from Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2006.

160. Rozen S SH. Primer3. [cited 2011-2012]; Available from: <http://primer3.sourceforge.net/>.

161. Levy L, Howell M, Das D, Harkin S, Episkopou V, Hill CS. Arkadia activates Smad3/Smad4-dependent transcription by triggering signal-induced SnoN degradation. *Mol Cell Biol.* 2007 Sep;27(17):6068-83.

162. Batut J, Howell M, Hill CS. Kinesin-mediated transport of Smad2 is required for signaling in response to TGF-beta ligands. *Dev Cell.* 2007 Feb;12(2):261-74.

163. Wong C, Rougier-Chapman EM, Frederick JP, Datto MB, Liberati NT, Li JM, et al. Smad3-Smad4 and AP-1 complexes synergize in transcriptional activation of the c-Jun promoter by transforming growth factor beta. *Mol Cell Biol.* 1999 Mar;19(3):1821-30.

164. Harlow E, Lane D. Using Antibodies: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY; 1999.

165. Illumina. Illumina Sequencing technology. Highest data accuracy, simple workflow, and a broad range of applications. San Diego [cited 2011]; Available from: http://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf.

166. GmbH GS. Genomatix: RegionMiner. Munich, Alemania1998-2012 [Junio 2011]; Available from: http://www.genomatix.de/online_help/help_regionminer/RNA_clustering.html.

167. Oliveros JC. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. Madrid2007 [cited 2011]; Available from: <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.

168. REUTERS T. GeneGo (MetaCore). 2012 [updated 2012]; Available from: <https://portal.genego.com/>.

169. Cruz GGoUS. The UCSC Genome Browser. Santa Cruz, California (EEUU)2006 [Mayo 2011-Marzo 2012]; Available from: <http://genome.ucsc.edu/>.

170. Agui T, Xin X, Cai Y, Shim G, Muramatsu Y, Yamada T, et al. Opposite actions of transforming growth factor-beta 1 on the gene expression of atrial natriuretic

peptide biological and clearance receptors in a murine thymic stromal cell line. *J Biochem.* 1995 Sep;118(3):500-7.

171. Waddell DS, Liberati NT, Guo X, Frederick JP, Wang XF. Casein kinase Iepsilon plays a functional role in the transforming growth factor-beta signaling pathway. *J Biol Chem.* 2004 Jul 9;279(28):29236-46.

172. Kanamoto T, Hellman U, Heldin CH, Souchelnytskyi S. Functional proteomics of transforming growth factor-beta1-stimulated Mv1Lu epithelial cells: Rad51 as a target of TGFbeta1-dependent regulation of DNA repair. *EMBO J.* 2002 Mar 1;21(5):1219-30.

173. Lin F, Morrison JM, Wu W, Worman HJ. MAN1, an integral protein of the inner nuclear membrane, binds Smad2 and Smad3 and antagonizes transforming growth factor-beta signaling. *Hum Mol Genet.* 2005 Feb 1;14(3):437-45.

174. Peng F, Zhang B, Wu D, Ingram AJ, Gao B, Krepinsky JC. TGFbeta-induced RhoA activation and fibronectin production in mesangial cells require caveolae. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008 Jul;295(1):F153-64.

175. Lai L, Chen J, Hao CM, Lin S, Gu Y. Aldosterone promotes fibronectin production through a Smad2-dependent TGF-beta1 pathway in mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Sep 15;348(1):70-5.

176. Li C, Zhu NL, Tan RC, Ballard PL, Derynck R, Minoo P. Transforming growth factor-beta inhibits pulmonary surfactant protein B gene transcription through SMAD3 interactions with NKX2.1 and HNF-3 transcription factors. *J Biol Chem.* 2002 Oct 11;277(41):38399-408.

177. Zheng M, McKeown-Longo PJ. Regulation of HEF1 expression and phosphorylation by TGF-beta 1 and cell adhesion. *J Biol Chem.* 2002 Oct 18;277(42):39599-608.

178. Thiele BJ, Doller A, Kahne T, Pregla R, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. RNA-binding proteins heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, E1, and K are involved in post-transcriptional control of collagen I and III synthesis. *Circ Res.* 2004 Nov 26;95(11):1058-66.

179. Takenaka IM, Hightower LE. Regulation of chicken Hsp70 and Hsp90 family gene expression by transforming growth factor-beta 1. *J Cell Physiol.* 1993 Apr;155(1):54-62.

180. Abdel-Razzak Z, Corcos L, Fautrel A, Campion JP, Guillouzo A. Transforming growth factor-beta 1 down-regulates basal and polycyclic aromatic hydrocarbon-induced cytochromes P-450 1A1 and 1A2 in adult human hepatocytes in primary culture. *Mol Pharmacol.* 1994 Dec;46(6):1100-10.

181. Cao Y, Ohwatari N, Matsumoto T, Kosaka M, Ohtsuru A, Yamashita S. TGF-beta1 mediates 70-kDa heat shock protein induction due to ultraviolet irradiation in human skin fibroblasts. *Pflugers Arch.* 1999 Aug;438(3):239-44.

182. Xu L, Bergan RC. Genistein inhibits matrix metalloproteinase type 2 activation and prostate cancer cell invasion by blocking the transforming growth factor beta-mediated activation of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2-27-kDa heat shock protein pathway. *Mol Pharmacol*. 2006 Sep;70(3):869-77.
183. Suzuki Y, Tanigaki T, Heimer D, Wang W, Ross WG, Murphy GA, et al. TGF-beta 1 causes increased endothelial ICAM-1 expression and lung injury. *J Appl Physiol*. 1994 Sep;77(3):1281-7.
184. Azmi P, Seth A. RNF11 is a multifunctional modulator of growth factor receptor signalling and transcriptional regulation. *Eur J Cancer*. 2005 Nov;41(16):2549-60.
185. Leong GM, Subramaniam N, Figueroa J, Flanagan JL, Hayman MJ, Eisman JA, et al. Ski-interacting protein interacts with Smad proteins to augment transforming growth factor-beta-dependent transcription. *J Biol Chem*. 2001 May 25;276(21):18243-8.
186. Wang H, Radjendirane V, Wary KK, Chakrabarty S. Transforming growth factor beta regulates cell-cell adhesion through extracellular matrix remodeling and activation of focal adhesion kinase in human colon carcinoma Moser cells. *Oncogene*. 2004 Jul 15;23(32):5558-61.
187. Liu X, Lee J, Cooley M, Bhogte E, Hartley S, Glick A. Smad7 but not Smad6 cooperates with oncogenic ras to cause malignant conversion in a mouse model for squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2003 Nov 15;63(22):7760-8.
188. Pazdrak K, Justement L, Alam R. Mechanism of inhibition of eosinophil activation by transforming growth factor-beta. Inhibition of Lyn, MAP, Jak2 kinases and STAT1 nuclear factor. *J Immunol*. 1995 Nov 1;155(9):4454-8.
189. Wu Y, Zhang X, Salmon M, Lin X, Zehner ZE. TGFbeta1 regulation of vimentin gene expression during differentiation of the C2C12 skeletal myogenic cell line requires Smads, AP-1 and Sp1 family members. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Mar;1773(3):427-39.
190. Maniscalco WM, Sinkin RA, Watkins RH, Campbell MH. Transforming growth factor-beta 1 modulates type II cell fibronectin and surfactant protein C expression. *Am J Physiol*. 1994 Nov;267(5 Pt 1):L569-77.
191. Chen R, Dioum EM, Hogg RT, Gerard RD, Garcia JA. Hypoxia increases sirtuin 1 expression in a hypoxia-inducible factor-dependent manner. *J Biol Chem*. 2011 Apr 22;286(16):13869-78.
192. Lim JH, Lee YM, Chun YS, Chen J, Kim JE, Park JW. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell*. 2010 Jun 25;38(6):864-78.
193. Langley E, Pearson M, Faretta M, Bauer UM, Frye RA, Minucci S, et al. Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J*. 2002 May 15;21(10):2383-96.
194. Borra MT, Smith BC, Denu JM. Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *J Biol Chem*. 2005 Apr 29;280(17):17187-95.

-
195. Kuwajerwala N, Cifuentes E, Gautam S, Menon M, Barrack ER, Reddy GP. Resveratrol induces prostate cancer cell entry into s phase and inhibits DNA synthesis. *Cancer Res.* 2002 May 1;62(9):2488-92.
196. Dai Y, Ngo D, Forman LW, Qin DC, Jacob J, Faller DV. Sirtuin 1 is required for antagonist-induced transcriptional repression of androgen-responsive genes by the androgen receptor. *Mol Endocrinol.* 2007 Aug;21(8):1807-21.
197. Zhang Y, Feng X, We R, Derynck R. Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response. *Nature.* 1996 Sep 12;383(6596):168-72.
198. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:753-91.
199. Byles V, Chmielewski LK, Wang J, Zhu L, Forman LW, Faller DV, et al. Aberrant cytoplasm localization and protein stability of SIRT1 is regulated by PI3K/IGF-1R signaling in human cancer cells. *Int J Biol Sci.* 2010;6(6):599-612.
200. Caito S, Rajendrasozhan S, Cook S, Chung S, Yao H, Friedman AE, et al. SIRT1 is a redox-sensitive deacetylase that is post-translationally modified by oxidants and carbonyl stress. *FASEB J.* 2010 Sep;24(9):3145-59.
201. Hisahara S, Chiba S, Matsumoto H, Tanno M, Yagi H, Shimohama S, et al. Histone deacetylase SIRT1 modulates neuronal differentiation by its nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Oct 7;105(40):15599-604.
202. Inman GJ, Hill CS. Stoichiometry of active smad-transcription factor complexes on DNA. *J Biol Chem.* 2002 Dec 27;277(52):51008-16.
203. Jinnin M, Ihn H, Tamaki K. Characterization of SIS3, a novel specific inhibitor of Smad3, and its effect on transforming growth factor-beta1-induced extracellular matrix expression. *Mol Pharmacol.* 2006 Feb;69(2):597-607.
204. Jinnin M, Ihn H, Asano Y, Yamane K, Trojanowska M, Tamaki K. Tenascin-C upregulation by transforming growth factor-beta in human dermal fibroblasts involves Smad3, Sp1, and Ets1. *Oncogene.* 2004 Mar 4;23(9):1656-67.
205. Zhu X, Liu Q, Wang M, Liang M, Yang X, Xu X, et al. Activation of Sirt1 by resveratrol inhibits TNF-alpha induced inflammation in fibroblasts. *PLoS One.* 2011;6(11):e27081.
206. Workman JL, Kingston RE. Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:545-79.
207. Carafa V, Nebbioso A, Altucci L. Sirtuins and disease: the road ahead. *Front Pharmacol.* 2012;3:4.
208. Napper AD, Hixon J, McDonagh T, Keavey K, Pons JF, Barker J, et al. Discovery of indoles as potent and selective inhibitors of the deacetylase SIRT1. *J Med Chem.* 2005 Dec 15;48(25):8045-54.
-

209. Pagans S, Pedal A, North BJ, Kaehlcke K, Marshall BL, Dorr A, et al. SIRT1 regulates HIV transcription via Tat deacetylation. *PLoS Biol.* 2005 Feb;3(2):e41.
210. GmbH GS. Genomatix. Munich, Alemania1998-2012 [Mayo- Junio 2011]; Available from: <http://www.genomatix.de>.
211. Johnson DS, Mortazavi A, Myers RM, Wold B. Genome-wide mapping of in vivo protein-DNA interactions. *Science.* 2007 Jun 8;316(5830):1497-502.
212. Jothi R, Cuddapah S, Barski A, Cui K, Zhao K. Genome-wide identification of in vivo protein-DNA binding sites from ChIP-Seq data. *Nucleic Acids Res.* 2008 Sep;36(16):5221-31.
213. Koinuma D, Tsutsumi S, Kamimura N, Taniguchi H, Miyazawa K, Sunamura M, et al. Chromatin immunoprecipitation on microarray analysis of Smad2/3 binding sites reveals roles of ETS1 and TFAP2A in transforming growth factor beta signaling. *Mol Cell Biol.* 2009 Jan;29(1):172-86.
214. Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol.* 1987 Jul 20;196(2):261-82.
215. Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jan 31;103(5):1412-7.
216. Boyle AP, Davis S, Shulha HP, Meltzer P, Margulies EH, Weng Z, et al. High-resolution mapping and characterization of open chromatin across the genome. *Cell.* 2008 Jan 25;132(2):311-22.
217. Hon GC, Hawkins RD, Ren B. Predictive chromatin signatures in the mammalian genome. *Hum Mol Genet.* 2009 Oct 15;18(R2):R195-201.
218. Cooper G. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. ed: Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.
219. Warner DR, Roberts EA, Greene RM, Pisano MM. Identification of novel Smad binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Dec 26;312(4):1185-90.
220. Brown KA, Ham AJ, Clark CN, Meller N, Law BK, Chytil A, et al. Identification of novel Smad2 and Smad3 associated proteins in response to TGF-beta1. *J Cell Biochem.* 2008 Oct 1;105(2):596-611.
221. Luo J, Su F, Chen D, Shiloh A, Gu W. Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature.* 2000 Nov 16;408(6810):377-81.
222. (NCBI) NCfBI. NCBI Protein Blast (Basic Local Alignment Search Tool). Bethesda, EEUU [cited 2012]; Available from: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins&PROGRAM=blastp&BLAST_PROGRAMS=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&DBSEARCH=true&QUERY=&SUBJECTS=.

223. Pan M, Yuan H, Brent M, Ding EC, Marmorstein R. SIRT1 contains N- and C-terminal regions that potentiate deacetylase activity. *J Biol Chem.* 2012 Jan 20;287(4):2468-76.
224. Kang MR, Lee SW, Um E, Kang HT, Hwang ES, Kim EJ, et al. Reciprocal roles of SIRT1 and SKIP in the regulation of RAR activity: implication in the retinoic acid-induced neuronal differentiation of P19 cells. *Nucleic Acids Res.* 2010 Jan;38(3):822-31.
225. Torres G, Frisella PD, Yousuf SJ, Sarwar S, Baldinger L, Zakhary SM, et al. A ChIP-cloning approach linking SIRT1 to transcriptional modification of DNA targets. *Biotechniques.* 2008 Jun;44(7):Pxii-Pxiv.
226. Mladenova V, Mladenov E, Russev G. ORGANIZATION OF PLASMID DNA INTO NUCLEOSOME-LIKE STRUCTURES AFTER TRANSFECTION IN EUKARYOTIC CELLS. *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* 2009;23.
227. Senawong T, Peterson VJ, Leid M. BCL11A-dependent recruitment of SIRT1 to a promoter template in mammalian cells results in histone deacetylation and transcriptional repression. *Arch Biochem Biophys.* 2005 Feb 15;434(2):316-25.
228. Senawong T, Peterson VJ, Avram D, Shepherd DM, Frye RA, Minucci S, et al. Involvement of the histone deacetylase SIRT1 in chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF)-interacting protein 2-mediated transcriptional repression. *J Biol Chem.* 2003 Oct 31;278(44):43041-50.
229. Chanda D, Xie YB, Choi HS. Transcriptional corepressor SHP recruits SIRT1 histone deacetylase to inhibit LRH-1 transactivation. *Nucleic Acids Res.* 2010 Aug;38(14):4607-19.
230. Yang YC, Piek E, Zavadil J, Liang D, Xie D, Heyer J, et al. Hierarchical model of gene regulation by transforming growth factor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Sep 2;100(18):10269-74.

