

Treball de Fi de Grau

*Determinació del complex SirT1-
SetDB1-KAP-1 i la seva funcionalitat
en la regulació de la cromatina.*

Júlia Ortega Bosch

Grau en Biotecnologia

Tutor/a: Laia Bosch Presegué

Vic, Juny del 2017

“ Igual que a les cèl·lules aïllades, el caràcter de la nostra existència es veu determinat no pels nostres gens, sinó per la nostra resposta a les senyals ambientals que impulsa la vida. “

- Bruce Lipton -

Resum

SirT1 és una desacetilasa d'histones dependent de NAD⁺, és la més estudiada de la família de les Sirtuïnes i s'ha descrit que juga un paper molt important en la regulació de la cromatina. SirT1, interacciona i desacetila el co-repressor de la família de les proteïnes TRIM, KAP-1 regulant així el seu paper en la reparació de DSB. Tanmateix, KAP-1 s'ha vist que forma un complex funcional amb SETDB1, metiltransferasa d'histones, el qual té un paper clau en el silenciament de l'expressió gènica. Ens vàrem plantejar determinar si les tres proteïnes SirT1, KAP-1 i SETDB1 formarien un complex funcional. Amb aquest objectiu, vam determinar l'expressió de SirT1, SETDB1 i KAP-1, prèviament clonades en vectors d'expressió i les seves interaccions, en condicions normals i sota condicions d'estrès. Finalment, vam estudiar si conformen un complex funcional i quina implicació podria tenir en la regulació de cromatina per co-fraccionament amb FPLC. Els nostres estudis demostren, SirT1 i KAP-1 interaccionen i que aquesta interacció es veu augmentada en condicions d'estrès. També hem vist que la sobre-expressió de SETDB1 provoca una deslocalització de la proteïna al citosol, ja que els seus nivells al nucli estan altament regulats. Tot i que no hem pogut demostrar l'existència d'un complex funcional entre SirT1, SETDB1 i KAP-1, sí que hem pogut demostrar que SirT1 i SETDB1 interaccionarien i que aquesta interacció no depèn d'estrès. Addicionalment, hem aconseguit una línia NIH3T3 KO per SirT1, utilitzant la tècnica CRISPR. Els resultats obtinguts ens han permès conèixer les relacions funcionals entre aquestes tres proteïnes i, ens permetrà dissenyar noves estratègies d'estudi en la regulació de la cromatina, en la reparació de danys i en el silenciament dels gens.

Paraules clau: cromatina, SirT1, SETDB1, KAP-1, CRISPR.

Abstract

SirT1 is a NAD⁺-dependent histone deacetylase which is the most studied member of Sirtuins family and it has been described as an important regulator of chromatin structure and function. SirT1 interacts and desacetylates the co-repressor of TRIM's proteins family, KAP-1, regulating his role in DSB repair. Moreover, it has been described that KAP-1 forms together with SETDB1, a histone methyltransferase, a functional complex which has an important role in gene silencing. We have been studied the SirT1, KAP-1 and SETDB1 expression, previously cloned in expression vectors, and their interactions in normal and under oxidative stress conditions. In addition, we studied if these proteins could form a functional complex, involved in chromatin regulation by FPLC co-fractionation. Our studies show that SirT1 and KAP-1 interact and this interaction increases under stress conditions. Moreover, we determined that SETDB1 over-expression causes its cytosolic delocalization, as a result of its highly regulated levels in the nucleus. Although, we could not determine the functional complex between SirT1, SETDB1 and KAP-1 we determine that SirT1 and SETDB1 interact and we observe that this interaction is not stress-dependant. Additionally, we have achieved a NIH3T3 cell line KO for SirT1, using CRISPR technique. All our results allow us to increase our knowledge about the functional relationship between these 3 proteins and open new strategy to design studies in chromatin regulation, DNA damage repair and gene silencing.

Keywords: chromatin, SirT1, SETDB1, KAP-1, CRISPR.

Agraïments

En primer lloc, agrair a la Laia per confiar amb mi i donar-me aquesta oportunitat per fer un pas més en el que m'agrada, la ciència. Per la gran paciència que ha tingut amb mi ajudant-me des del primer dia, per tirar endavant i resoldre qualsevol entrebanc, amb tota la energia i de la millor manera. Gràcies per no deixar-me decaure i donar-me una empenta quan no veia les coses clares, per deixar equivocar-me i corregir-me els errors, per ensenyar-me i guiar-me. De veritat, t'estic molt agraïda, per haver après de tu, i haver compartit aquest projecte dins del laboratori. També agrair a totes els companys del laboratori, Jèssica, Maria, Pau, Nico, George i en especial a l'Àlex per deixar-me emprendre aquest projecte dins del seu grup de recerca. Gràcies a tots i a cada un de vosaltres per facilitar-me el dia a dia, per recolzar-me en tot moment i donar-me un cop de mà sempre que ho necessitat. M'heu fet sentir com a casa, per lo pròxims que heu sigut amb mi. Gràcies per fer sentir bé a la gent.

També agrair als meus pares, pel suport incondicional en aquesta etapa que deixo enrere, per facilitar-me les coses en el meu dia a dia i poder-me dedicar i treballar exclusivament a això. Gràcies per escoltar-me i aguantar els meus alts i baixos, però sobretot gràcies per ser els meus pares; per al meu germà per la paciència i tolerància que ha tingut amb mi, per recolzar-me i animar-me a seguir endavant, de veritat, gràcies; i per en Pau, qui m'ha escoltat llegint i rellegint articles, sense entendre res, però fent-me sentir millor. Qui ha estat assegut en un sofà mirant com escrivia només per fer-me companyia, qui m'ha aguantat en els millors, però sobretot en els pitjors moments. Gràcies per ser la persona que ets. Us estimo!

Gràcies a tots i totes per haver format part d'aquesta experiència, no ho oblidaré.

Índex

INTRODUCCIÓ	1
L'epigenètica	1
Mecanismes epigenètics	1
Metilació de l'ADN	3
ARNs no codificants	3
Modificacions postraduccionals	3
Modificacions postraduccionals	4
Acetilació	6
Metilació	7
La cromatina	7
Estructura de la cromatina	7
Organització de la cromatina	8
Euromatina i Heterocromatina	8
Heterocromatina facultativa i Heterocromatina constitutiva	8
Les Sirtuïnes	10
SirT1	11
Estructura i regulació	11
Funcions	12
SETDB1	14
Estructura i regulació	14
Funcions	15
KAP-1	16
Estructura i regulació	16
Funcions	17

CRISPR	17
ANTECEDENTS	19
Complex SirT1 – KAP-1	19
Complex SETDB1 – KAP-1	19
RESULTATS	21
1. Complex SirT1/SETDB1/KAP-1	21
Coexpressió de les proteïnes clonades	21
Interacció entre SirT1/SETDB1/KAP-1	22
Co-localització de les proteïnes clonades	24
Detecció del complex SirT1/SETDB1/KAP-1	26
2. CRISPR	28
Dissey dels ARNg	28
Clonatge dels ARNg i seqüenciació del vector	29
Formació de clons positius	29
Detecció de clons positius	30
DISCUSSIÓ DE RESULTATS	32
1. Determinació del complex SirT1/SETDB1/KAP-1	32
2. CRISPR	34
CONCLUSIONS	35
BIBLIOGRAFIA	36
ANNEX	44
MATERIALS I MÈTODES	44
SEQÜÈNCIES DELS ARNg	49
SEQÜÈNCIES DE CLONATGE	49
SORTER	51

INTRODUCCIÓ

L'epigenètica

La genètica moderna ens ensenya que no només la seqüència de l'ADN determina el fenotip d'un individu sinó que també ve regulat per les influències del medi ambient, així com la nutrició, l'estrès i/o les substàncies tòxiques, entre d'altres, que intervenen en la regulació de l'expressió gènica sense canviar la seqüència de l'ADN.

L'epigenètica és la ciència que estudia com aquests efectes de l'ambient influeixen en l'expressió dels gens i com es transmeten d'una generació a una altra. Estudia les alteracions heretables en l'expressió dels gens derivades de canvis químics en l'ADN o a les histones. (Karanth et al., 2017)

Així doncs, durant el desenvolupament el zigot que conté un genoma és programat epigenèticament generant una multitud d'epigenomes en més de 200 tipus cel·lulars diferents. Cada individu té doncs un genoma, una seqüència d'ADN invariable, i diferents epigenomes. L'epigenoma seria la composició global de la cromatina formada per l'ADN, amb la informació genètica, i les proteïnes històniques i no històniques que l'empaqueten.

Mecanismes epigenètics

La cromatina és una estructura dinàmica que adapta el seu estat de compactació i empaquetament segons les necessitats de la cèl·lula. Així doncs, l'estructura i les modificacions de la cromatina representen un nivell addicional de regulació per a tots aquells processos metabòlics de l'ADN inclosos la transcripció, recombinació, reparació, replicació, formació del centròmer, etc. Tots ells actuen com a plataforma on s'integren les senyals biològiques i tenen lloc les respostes moleculars. La cèl·lula ha desenvolupat diferents mecanismes epigenètics per tal de modificar de forma temporal/espacial l'organització de la cromatina.

Així doncs, la regulació de la cromatina és un procés finament controlat i que comprèn diferents mecanismes epigenètics que es coordinen entre ells per assegurar la correcta organització d'aquesta en cada moment i per preservar la integritat genòmica i l'expressió gènica. Els mecanismes epigenètics més importants són (Figura 1):

- 1) La metilació de l'ADN
- 2) El paper senyalitzador dels ncRNA
- 3) Modificacions postraduccionals de les histones i variant d'histones, que afecten tant a l'estructura global de la cromatina com l'activació o repressió gènica.

INTRODUCCIÓ

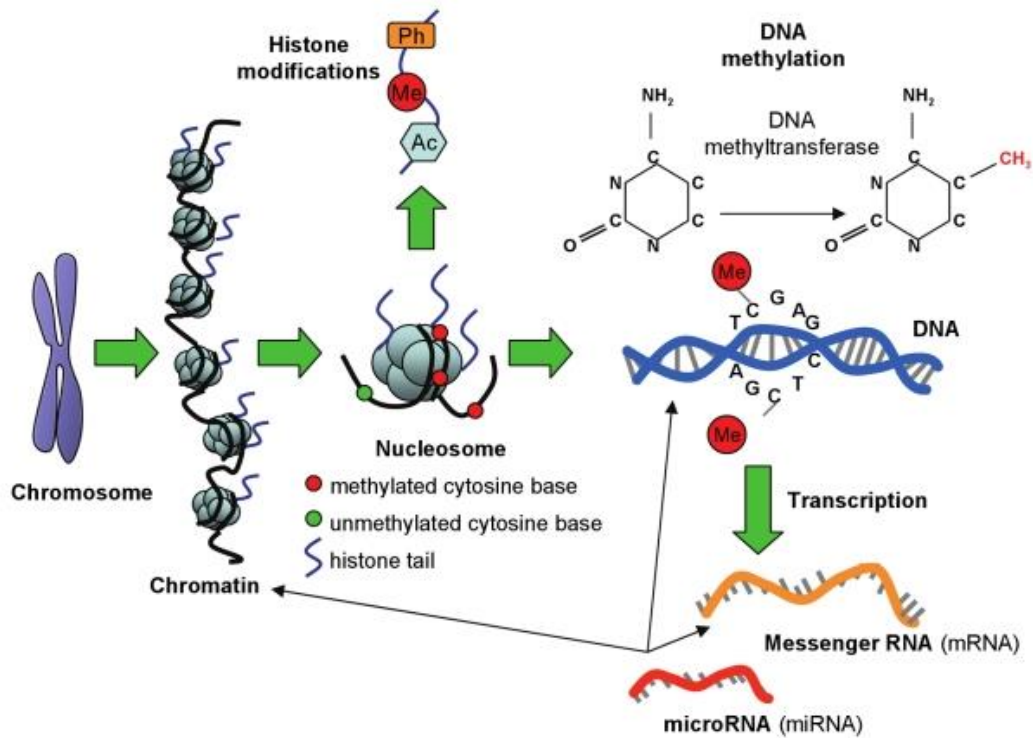


Figura 1. El cromosoma és la forma més compacte de la cromatina, i la unitat bàsica de la cromatina és el que coneixem com nucleosomes. Aquests nucleosomes es consisteixen en un octàmer d'histones sobre el qual s'enrotlla la doble hèlix d'ADN. Les histones estan vestides amb una sèrie de modificacions, com ara, l'acetilació (Ac), la fosforilació (ph) i la metilació (me) i aquestes modificacions regulen la compactació d'aquesta cromatina. Per altra banda, les molècules d'ADN són metilades, mitjançant l'addició d'un grup metil a una citosina que està de costat amb una guanina, mecanisme epigenètic molt important que regula l'expressió dels gens. Per obtenir l'estructura d'una proteïna prèviament cal transcriure l'ADN a ARN missatger (mRNA), en aquest pas tenim que l'ARNmicro (miRNA) es pot unir a aquesta molècula d'ARN missatger per regular la seva expressió. (Relton & Davey Smith, 2010)

No obstant, cal destacar-ne la seva importància ja que l'alteració de la informació epigenètica, dóna lloc a una desregulació de l'expressió gènica resultant en el desenvolupament de diverses patologies, com poden ser el càncer o les malalties neurodegeneratives. (Vaquero, 2009)

INTRODUCCIÓ

Metilació de l'ADN

Les illes CpG, són regions d'ADN constituïdes per una gran concentració de parells de citocines i guanines enllaçades per fosfats que es troben a la zona promotora d'un 40% dels gens dels mamífers. A diferència de les illes CpG que estan desmetilades si els gens estan expressats, els llocs CpG de la regió codificant, en la majoria de casos, no. És per aquest motiu que es considera un dels principals mecanismes epigenètics, el qual permet una conformació tancada de la cromatina i, en conseqüència, el silenciament de gens.

ARNs no codificants

Fa deu anys enrere, aproximadament, es va observar una gran explosió del nombre d'ARNs detectats que en aparença no tenien una potent codificació per proteïnes (ARNs no codificants). Des d'aquest moment els científics es plategen el gran paper senyalitzador d'aquestes molècules en la regulació de les funcions vitals de les cèl·lules i en l'expressió dels gens: al genoma poden actuar, per exemple, com a oncògens o gens supressors de tumors, en funció de la via a la qual participen, o si regulen positiva o negativament l'expressió de gens concrets.

Així doncs, l'expressió de milers de gens ve regulada pels ARNnc i pot ser una regulació cis o trans, més concretament per un tipus determinat de ARNnc, els "enhancer RNAs". Pel que fa la regulació trans els ARNs missatgers, mitjançant les quals els ARNmicro, tenen una alta implicació i poden reduir els nivells d'expressió dels gens amb la finalitat d'inhibir-la. Per altra banda, altres ARNnc estan units a la regió no codificant dels gens codificants de proteïnes i influeixen en la seva expressió de diverses maneres, segons el tipus específic de ARNnc que actua: ARN líder, elements de resposta al ferro o llocs d'entrada interns dels ribosomes.

Modificacions postraduccionals

Modificacions en forma individual de les histones poden generar modificacions importants en la organització de la cromatina en el nucli de la cèl·lula eucariota, tenint com a conseqüència directe canvis, de manera selectiva, de l'expressió dels gens. Anomenem a aquests canvis modificacions postraduccionals de les histones.

INTRODUCCIÓ

Modificacions postraduccionals de les histones

Mentre que a principis del 1990 les histones eren descrites com simples substrats inerts pel plegament de l'ADN una dècada després va ser reconeguda la seva funció reguladora. Vicente Allfrey i Alfred Mirsky van ser els primers investigadors que van proposar un paper important de les modificació de les histones en l'activació transcripcional descrivint l'acetilació i la metilació d'histones. (DesJarlais & Tummino, 2016);(Verdin & Ott, 2015)

Les histones són proteïnes molt bàsiques i molt conservades evolutivament que contenen un alt percentatge de lisines i arginines i serveixen d'esquelet per l'enrotllament de l'ADN. Tenen una estructura estèticament molt diferenciables, ja que estan compostes per dues regions: el domini central es troba plegat i així doncs interaccionant amb l'ADN, format per una hèlix- α llarga flaquejada per dues hèlix- α curtes. Per altra banda contenen un domini més perifèric, que surt del domini central, anomenat cues d'histones. Com el mateix nom diu, aquest domini és un domini N-terminal flexible poc estructurat i compost per 15-30 residus. Aquests residus poden patir diferents modificacions postraduccionals que poden afectar a l'estructura de la cromatina i la seva funció.

Des dels estudis que van fer Allfrey i els seus col·legues, la investigació de les modificacions d'histones han anat avançant fins a dia d'avui poder descriure fins a 8 tipus diferents de modificacions, que tenen una gran rellevància funcional i en que la seva desregulació juga un paper en patogènesis. Aquesta gran varietat de modificacions i la seva combinació proporciona un enorme potencial de respostes funcionals. (Vaquero, Loyola, & Reinberg, 2003);(Rodriguez & Bjerling, 2013)

Les diferents modificacions d'histones actuen de forma combinada per formar el denominat codi d'histones. Així doncs, el conjunt de modificacions postraduccionals en les histones estaria altament regulat i sembla ser que funcionaria com un llenguatge. També hi hauria una regulació de les modificacions entre si; hi hauria regulacions positives i negatives entre modificacions i podrien ser tant regulacions dins la mateixa cua d'histones (cis) com entre dues cues d'histones diferents (trans).

INTRODUCCIÓ

MODIFICACIÓ	RESIDUS	FUNCIÓ	ENZIMS
Acetilació	K-ac	Transcripció (activació), reparació, replicació	Lisina acetil transferases (KATs)
Metilació (lisines)	K-me	Transcripció (activació o repressió), reparació	Lisina metil transferases (KMTs)
Metilació (arginines)	R-me	Transcripció (activació o repressió)	Arginina metil transferases
Ubiquitinització	K-ub	Transcripció (activació o repressió)	Ubiquitilases
Fosforilació	S-ph, T-ph	Transcripció (activació), reparació, condensació	Serin/treonin quinases
Sumoilació	K-su	Transcripció (repressió)	
ADP-ribosilació	E-ar	Transcripció	Poli ADP Ribosa Polimerases (PARPs)
Deiminació (arginina>citrul·lina)	R>Cit	Transcripció (repressió)	PAD14
Isomerització de la Prolina	P-cis>P-trans	Transcripció (repressió)	Prolil-isomerases

Taula 1. Modificacions postraduccionals descrites fins l'actualitat. A la taula s'indica els residus aminoacídics sobre els quals té lloc la modificació, la funció que tenen sobre el gen i els principals enzims que catalitzen els diferents tipus de modificacions postraduccionals.

Considerem el codi d'histones com un tipus de llenguatge, el qual representa un sistema de comunicació amb una finalitat biològica. Primerament definim els anomenats “writers” que són les proteïnes o enzims encarregats de catalitzar la incorporació de la modificació, per tant d'escriure aquest llenguatge. En segon lloc, tenim unes proteïnes les quals tenen la funció de llegir el què està escrit, són proteïnes (“readers” o efectors) que contenen dominis específics d'interacció i que inicien respostes biològiques com l'activació o la repressió de la transcripció, condensació cromosòmica, reparació de

INTRODUCCIÓ

l'ADN, etc. I les “erasers”, unes proteïnes encarregades d'esborrar aquest missatge, per tant encarregades de la eliminació de les modificacions.

Les modificacions postraduccionals més estudiades i que tenen un paper molt important en la regulació de la cromatina són l'acetilació i la metilació.

Acetilació

L'acetilació és una modificació que té lloc en els residus de lisina (Lys) de les histones afegint un grup acetil al grup amino dels residus de les Lys. El grup acetat a la cadena lateral de la lisina canvia la càrrega neta de la histona i genera una repulsió de càrregues entre nucleosomes adjacents i el propi nucleosoma donant lloc a una cromatina més descondensada. Així doncs, l'acetilació de les histones regula l'estructura de la cromatina i activa l'expressió gènica de dues maneres diferents però coordinades. (Allis, Jenuwein, Reinberg, & Caparros, 2007)

Primerament, l'acetilació en el promotor del gen resulta en una baixada en la densitat de nucleosomes en tota la regió gènica i en especial als promotors en comparació a les regions intergèniques. Així doncs, al obrir-se l'estructura de la cromatina degut a l'acetilació de les histones es permet l'accés a diferent maquinària; com podria ser la de reparació de l'ADN o la transcripció, entre d'altres. Així doncs, per exemple, les regions promotores dels gens transcripcionalment actius presenten alts nivells d'acetilació de H3K14, H3K9 i H4K16. En segon lloc, hi ha una sèrie de proteïnes encarregades de reconèixer les lisines acetilades (Lys-Ac), a través d'uns dominis d'interacció específics coneguts com a “bromo-domain”. La unió d'aquestes proteïnes (readers) a les histones pot desencadenar l'activació d'una cascada de modificacions i interaccions amb altres proteïnes per tal de generar una resposta funcional (Allis et al., 2007) (Kouzarides, 2007).

L'equilibri entre la forma acetilada i desacetilada de les histones està controlat per les activitats enzimàtiques d'histones acetiltransferases (HAT) i d'histones desacetilases (HDAC). (Seto & Yoshida, 2014) Les HATs catalitzen la incorporació d'un grup acetat a un residu de Lys del substrat (writers) i les HDAC la seva eliminació (erasers). (Shahbazian & Grunstein, 2007). Així doncs, l'activitat catalítica d'aquests enzims resulta en la regulació de l'estructura de l'heterocromatina i conseqüentment en la regulació de l'expressió gènica (Raurell Vila, 2014).

INTRODUCCIÓ

Metilació

La metilació de les histones és un procés pel qual un o més grups metil és transferit a un aminoàcid de les histones. Succeeix en els residus bàsics de la proteïna, en les Lisines (Lys) i Arginines (Arg). Les Lys poden ser mono-, di- o tri-metilades i les Arg mono- o di-metilades. (Kouzarides, 2007) A diferència de l'acetilació la metilació de les histones no resulta en l'alteració de la càrrega del residu en la cua d'histones però si que incrementa la basicitat i la hidrofobicitat facilitant el reclutament efectiu i/o factors de transcripció a l'ADN. Aquest mecanisme pot incrementar o disminuir la transcripció dels gens, depenent de quin aminoàcid sigui metilat i de quants grups metil siguin afegits. (Q.-J. Zhang & Liu, 2015)

L'equilibri entre els diferents nivells de metilació i la forma desmetilada està finament controlat per les activitats de metiltransferases (HMTs) (writers) i de demetilases (HDMs) (erasers), enzims que catalitzen la incorporació o eliminació del grup metil respectivament.

Estudis sobre la metilació d'histones, descriuen que aquest mecanisme està altament implicat en la regulació de l'expressió gènica i que en conseqüència està associat a malalties actualment molt estudiades per la ciència, com el càncer o malalties neurodegeneratives. (Kramer, 2013).

La cromatina

Estructura de la cromatina

L'ADN de les cèl·lules eucariotes es troba localitzat en el nucli cel·lular, i juntament amb les histones formen una estructura anomenada cromatina. La cromatina és un mediador de resposta crucial de la senyalització de resposta de supervivència i un dels objectius principals de les mesures de protecció en eucariotes.

Com ja hem comentat anteriorment, la cromatina és una molècula dinàmica organitzada dins del nucli cel·lular. Aquesta estructura no és homogènia; està organitzada en una successió de diferents nivells de compactació començant per la unitat bàsica de la cromatina, el nucleosoma. El nucleosoma està constituït pel nucleosoma central, la histona H1 i l'ADN connector. El nucleosoma central consisteix en 146pb d'ADN envoltant un octàmer d'histones, format per un tetràmer d'H3-H4 i dos dímers d'H2A-H2B (Kouzarides, 2007; Wu & Grunstein, 2000). La forma més laxa i accessible de la

INTRODUCCIÓ

cromatina es coneix són els nucleosomes en cadena o en anglès “beads-on-a-string”. Es coneix així per la imatge d'aquesta estructura obtinguda per microscòpia electrònica (fibra d'11nm). Seguidament, la fibra d'11nm s'ordena durant la interfase per tal d'augmentar d'ordre de compactació i formar la fibra helicoïdal de 30nm, aquesta s'organitza per formar un estat més compacte, arribant a la forma més compactada, el cromosoma metafàsic durant la divisió nuclear, mitosi i meiosi (Figura 2) (Vaquero, 2009).

Organització de la cromatina

Euromatina i Heterocromatina

L'estructura de la cromatina no només determina la distribució física en el genoma, sinó que també juga un paper molt important en l'accés controlat de la informació genètica i, per tant, de l'expressió del gen. (Bosch-Presegué & Vaquero, 2015)

Degut a aquest factor podem classificar la cromatina segons la seva compactació: l'euromatina i l'heterocromatina. I, depenen de la compactació es diferencien diferents funcionalitats de la cromatina. El control de moltes de les funcions cel·lulars, ara la transcripció i la replicació, ve regulat per la transició entre ambdós nivells organitzatius de la cromatina, per aquest motiu poden considerar que és vital aquesta regulació de l'estat de la cromatina a nivell cel·lular.

L'euromatina és la forma més lleugerament compactada de les dues anomenades i en conseqüència per ser la forma més activa transcripcionalment i es caracteritza per contenir una alta concentració de gens. Aquesta transcripció és afavorida gràcies a una sèrie de modificacions postraduccionals, de les quals hem parlat anteriorment, que faciliten l'accés de factors de transcripció a les regions promotores i es duu a terme una transcripció més eficient mitjançant l'ARN polimerasa II (Rodríguez & Bjerling, 2013; Vaquero, 2009).

L'heterocromatina és una forma més compactada de cromatina, es troba localitzada a la zona perifèrica del nucli que està associada a regions transcripcionalment inactives i es caracteritza per un enriquiment en seqüències repetitives d'ADN. No obstant, conté una baixa densitat de gens.

Heterocromatina facultativa i Heterocromatina constitutiva

A diferència de l'euromatina, l'heterocromatina es pot subdividir en dos nivells segons la seva dinàmica dins de la funcionalitat i l'estructura. Per una banda tenim l'heterocromatina constitutiva (HC), permanentment silenciada i amb una funció

INTRODUCCIÓ

bàsicament estructural, com serien els centròmers i telòmers, importants per a la protecció dels extrems dels cromosomes i la separació de les cromàtides en la mitosi. Aquest tipus d'heterocromatina conté un gran nombre de seqüències curtes repetides en tàndem. Per altra banda, definim l'heterocromatina facultativa (HF), un subtipus de cromatina compacte que és diversa en els diferents tipus cel·lulars i que conté més abundància de contingut de gens. L'HF és silenciada transcripcionalment, ara bé, pot descompactar-se i passar a eucromatina i així doncs permetre la transcripció en diferents contextos: espacial (canvis de localització nuclear, del centre a la perifèria o viceversa, a causa de factors externs), temporal (etapes específiques del cicle cel·lular) (Vaquero, 2009)¹² o parental/hereditari (expressió gènica monoal·lèlica).¹¹ Tanmateix, L'HF pot ocupar des de un cromosoma sencer, com ara el cromosoma X inactiu de les femelles, limitar-se a les regions reguladores de gens definits, com poden ser els promotors, o bé, abarcar grans distàncies genòmiques, per exemple gens homeòtics (Rodríguez & Bjerling, 2013; Trojer & Reinberg, 2007; Vaquero, 2009).

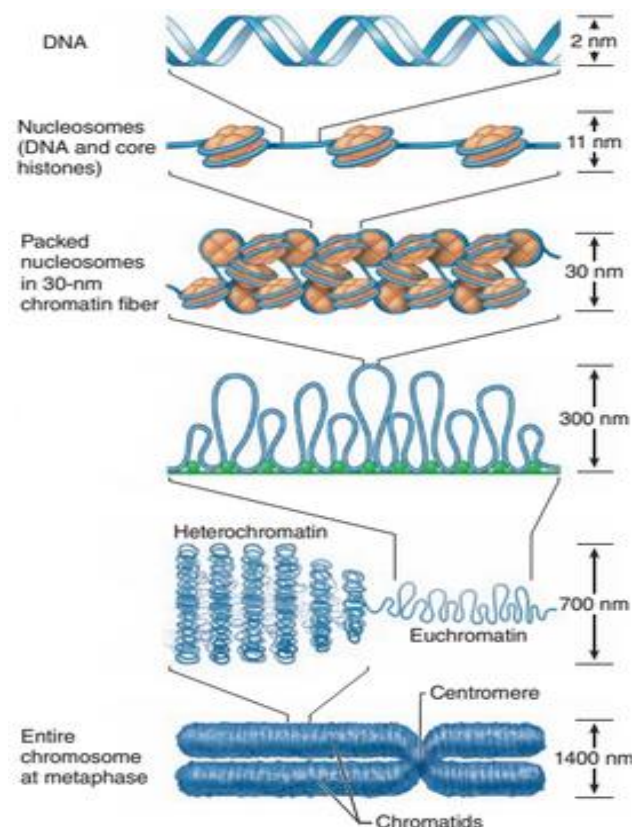


Figura 2. Formació de la cromatina. La doble hèlix d'ADN (2nm) s'enrotlla conjuntament amb proteïna d'histones i no d'histones per formar la unitat bàsica de la cromatina, el nucleosoma. L'ordenació d'aquestes fibres d'11nm dona lloc a una fibra de 30nm, la cromatina, la qual es compacta i, finalment, forma el cromosoma. El cromosoma està compost per les seves dues respectives cromàtides unides per un centròmer.

INTRODUCCIÓ

Les Sirtuïnes

La història de les Sirtuïnes comença amb la identificació de Sir2 (Silent Information Regulator 2) fa quasi tres dècades enrere (Ivy, Klar, & Hicks, 1986; Shore, Squire, & Nasmyth, 1984). Les Sirtuïnes són una família d'enzims que es troben, a la vegada, en procariotes i eucariotes. Aquests enzims són desacetilases d'histones dependents de NAD⁺ (HDACs). El requeriment del coenzim NAD⁺ per les Sirtuïnes ha portat a parlar de les Sirtuïnes com a sensors metabòlics ja que poden detectar un augment de la proporció NAD⁺/NADH respecte les condicions normals i promoure una resposta coordinada a aquestes condicions a través, entre altres coses, del silenciament de certs gens o certes regions del genoma (Vaquero, 2009). És per aquest motiu que les Sirtuïnes juguen un paper molt important en el manteniment de la integritat del genoma.

Fins a dia d'avui, en mamífers s'han trobat descrites set Sirtuïnes, denominades SirT1, SirT2, SirT3, SirT4, SirT5, SirT6 i SirT7. Tots aquests tipus de Sirtuïnes ens permeten obtenir una gran diversificació a nivell funcional i de localització. Si organitzem les Sirtuïnes a nivell funcional, podem veure que han aportat una gran varietat de substrats, proteïnes histones i proteïnes no histones. Per altra banda, si mirem des d'un patró de localització cel·lular, les podem diferenciar en aquelles que estan expressades al nucli, al nuclèol, al citoplasma i/o als mitocondris (Taula 2). Tot i la seva diferenciació a nivell de substrat i de localització, les diferents Sirtuïnes s'han mantingut, de forma evolutiva, lligades a la regulació de la cromatina, a través d'un paper important en la diafonia entre els canvis ambientals i el genoma (Bosch-Presegué & Vaquero, 2015; Ralser, Michel, & Breitenbach, 2012; Vaquero, 2009).

La importància del rol que juguen les Sirtuïnes en aquests processos es veu reflectida per la seva participació en un ample rang de patologies humanes, com poden ser la diabetis a nivell endocrí, el càncer o les malalties neurodegeneratives, entre d'altres. Les funcions més rellevants d'aquests enzims inclouen la senyalització sota estrès, el control de la supervivència cel·lular, el manteniment de l'estabilitat genòmica i la regulació del metabolisme (Raurell Vila, 2014).

INTRODUCCIÓ

Sirtuïna	Localització	Enzim	Funcionalitat
SirT1	Nucli	Deacetilasa	Silenciament transcripcional, senyalització insulina, tumorigenèssis, regeneració de teixits, diferenciació, resposta a estrès, etc.
SirT2	Citoplasma	Deacetilasa	Mitosis, envelliment del cervell, diferenciació d'adipòcits, integritat del genoma, catalabolisme oxidatiu, etc.
SirT3	Mitocondri	Deacetilasa	Oxidació dels àcids grassos, cicle TCA, fosforilació oxidativa, estrès oxidatiu.
SirT4	Mitocondri	ADP-ribosilasa	Cicle TCA, oxidació dels àcids grassos.
SirT5	Mitocondri	Deacetilasa	Cicle de la urea.
SirT6	Nucli	Deacetilasa, ADP-ribosilasa	Estabilitat del genoma, silenciament de la telomerasa
SirT7	Nucli	Desconegut	Transcripció ADNr

Taula 2. Funcionalitat de la família de les sirtuïnes. Aquesta taula ens mostra els diferents components de la família Sir2, la localització de cada Sirtuïna, quin tipus d'enzim és segons la seva activitat catalítica i finalment la funcionalitat de cada Sirtuïna en la integritat del genoma i el metabolisme cel·lular (Dang, 2014).

SirT1

La Sirtuïna 1 (SirT1) és el membre més estudiat de la família de les Sirtuïnes. Una de les funcions més importants i que és del nostre interès és la seva implicació en la regulació de l'estructura de la cromatina i per conseqüència en el manteniment de l'estabilitat genòmica.

Estructura i regulació

La Sirtuïna 1, és una proteïna codificada pel gen *sirt1*. A nivells d'estructura proteica està composta per un domini central catalític, conservat en totes les Sirtuïnes, i ambdós extrems terminals N- i C- que serveixen com a dominis d'interacció amb proteïnes reguladors i substrats, algun exemple mostrat a la Figura 3. (Kondo, Goto, Mimura, & Matsubara, 2016; Mimura, Kaji, Noma, Funatsu, & Okamoto, 2013). Aquesta característica permet a SirT1 tenir un gran ventall de funcions, principalment nuclears, tot i això, a seva localització pot ésser variable segons el tipus cel·lular, l'etapa de

INTRODUCCIÓ

desenvolupament i les condicions d'estrès i tot gràcies a que conté dues senyals de localització nuclear i dues d'exportació nuclear (Cantó & Auwerx, 2012).

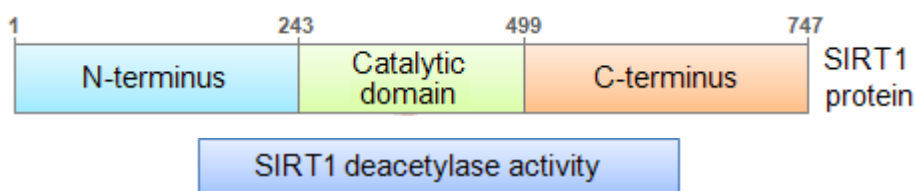


Figura 3. Estructura de SirT1. Dominis AROS i SENP1, domini N-terminal i C-terminal, respectivament, que interaccionen amb altres proteïnes i el domini catalític, DBC1.

Funcions

S'ha descrit que en situacions d'estrès energètic/nutricional l'activitat de SirT1 incrementa, això sumat al fet de que les Sirtuïnes utilitzen el NAD⁺ com a cofactor en la reacció que catalitzen, fa que SirT1 sigui considerat com a un dels sensors metabòlics de l'estat redox de la cèl·lula i un important mediador de la resposta biològica. Les funcions de SirT1 venen donades segons la seva localització tal com s'ha comentat anteriorment. La principal funcionalitat de SirT1 és nuclear i es caracteritza per tenir un paper clau en la regulació de l'estructura de la cromatina així com també inhibir o activar els reguladors de la transcripció i les seves respectives interaccions, depenent clarament del context cel·lular, de manera que té una funció molt variada i dinàmica. (Cantó & Auwerx, 2012; Kang et al., 2017).

INTRODUCCIÓ

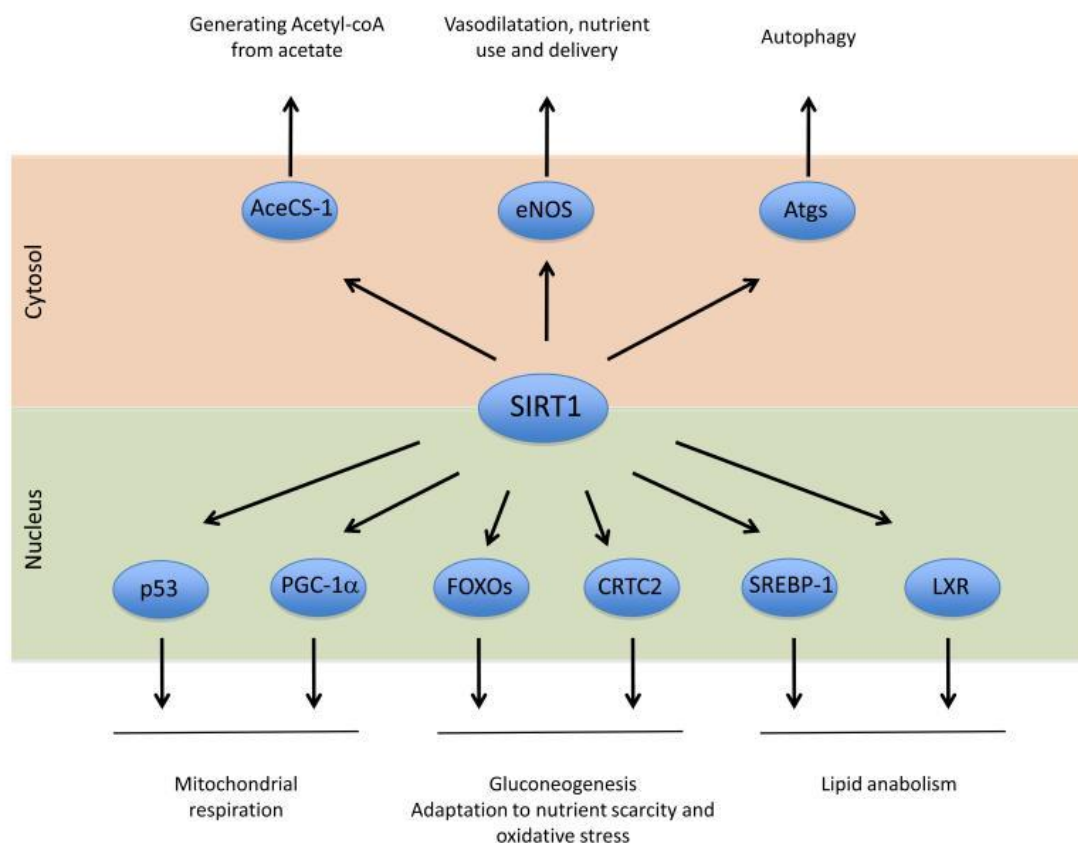


Figura 4. SirT1 pren una funció de desacetilasa tant nuclear com citoplasmàtica. Fora del nucli, és capaç desacetilar els enzims Acetyl-CoA Synthase (AceCS-1), del Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) i en últim lloc per formar complexos moleculars amb components crítics d'autòfagia (Atgs). SirT1 dins del nucli té una relació funcional amb altres enzims diferents dels del citosol: interacciona i desacetilitza p53 i el coactivador transcripcional de proliferació del peroxisoma (PGC-1 α), treu el grup acetil de la família de factors de transcripció Forkhead-O-box (FOXOs) i del co-activador transcripcional 2 (CRTC-2) que regulen la proteïna cAMP Response Element-Binding (CREB), finalment SirT1 està implicada en l'anabolisme dels lípids, activant uns estimuladors de l'anabolisme dels lípids (LXR) i l'sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP1c). (Cantó & Auwerx, 2012)

Per altra banda, quan SirT1, en alguns tipus cel·lulars, és citoplasmàtic, com és el cas de manca d'insulina adopta un paper molt important en la modificació de l'activitat de tots aquells enzims citoplasmàtics amb una desacetilació directa. L'estudi de SirT1 citoplasmàtic va ser degut al descobriment de la desacetilació de l'anomenat Acetyl-CoA

INTRODUCCIÓ

Synthase 1 (AceCS-1). Un enzim citosòlic que únicament pot ser desacetilat per la Sirtuïna 1 (Figura 4) (Cantó & Auwerx, 2012).

SETDB1

Estructura i regulació

La proteïna SET Domain Bifurcated 1 (SETDB1), una metiltransferasa d'histona que trimetiliza la lisina 9 de la histona H3 (H3K9), és una proteïna que conté una regió C-terminal formada per un domini catalític anomenat SET (Wang et al., 2003). Aquest domini es subdivideix en la regió conservada, pre-SET i en la regió implicada en la metilació d'histones, domini post-SET. A més a més, la separació entre els subdominis SET és una cadena inserida de 347 aminoàcids la qual està present només en SETDB1, i no en cap altra metiltransferasa amb domini SET, i es conserva a través de diversos organismes. La funció exacte d'aquesta seqüència intermèdia és desconeguda (Karanth et al., 2017). Per altra banda, a l'extrem N-terminal, SETDB1 conté dos dominis més els quals fan únic a aquest enzim respecte totes les altres proteïnes metiltransferases d'histones, TUD-1 i TUD-2 (Figura 5) (Karanth et al., 2017). Aquests dos dominis actuen com adaptadors moleculars, vinculant sobre els seus substrats per promoure les interaccions físiques i l'acoblament de complexes macromoleculars (Pek, Anand, & Kai, 2012).

La seva localització és diversa, ja que es considerava un enzim present en el nucli, però estudis realitzats recentment han demostrat que localitza tant en el nucli com en el citoplasma. La reacció catalitzada per SETDB1 es duu a terme en el nucli, és per aquest motiu que els científics donaven per fet que la seva localització era exclusivament nuclear, ara bé, després dels estudis de Tachibana et al. es va corroborar que SETDB1 pot patir una degradació proteosomal i ser exportat al citosol. En conseqüència s'observa la seva expressió en el citoplasma (Karanth et al., 2017; Tachibana et al., 2015). No obstant, estudis posteriors, han demostrat que aquest enzim de forma endògena si que es caracteritza per localitzar-se en el nucli, mentre que quan aquesta proteïna està sobre-expressada la seva localització passa a ser citoplasmàtica degut a que els nivells de SETDB1 en el nucli estaries altament regulats (Cho, Park, & Kang, 2013).

INTRODUCCIÓ

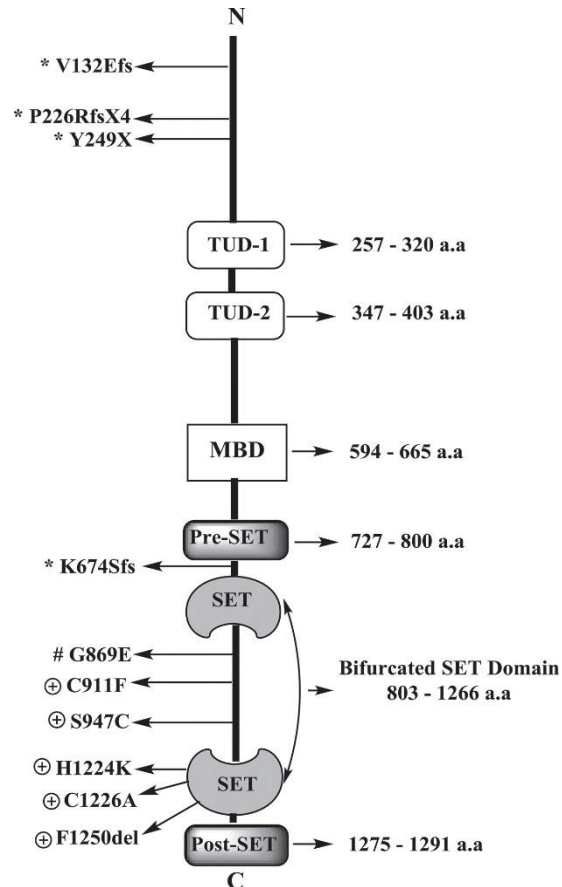


Figura 5. Divisió dels dominis proteics de SETDB1. Esquema dels diferents dominis que fan exclusiva aquesta proteïna, des de l'extrem C-terminal (C) amb el domini catalític SET, fins l'extrem N-terminal (N), amb els dos dominis TUD-1 i TUD-2.

Funcions

SETDB1 catalitza la metilació d'H3K9me2 a H3K9me3 mitjançant l'ajuda d'una ATPasa, regulant així l'expressió dels gens diana. Tanmateix, aquest enzim té un ampli rang d'implicació, remarcant la seva participació en la compactació de l'heterocromatina durant la diferenciació cel·lular, el desenvolupament, la mort cel·lular i la carcinogènesi (Raurell Vila, 2014). També s'ha descrit que juga un paper clau en el silenciament de gens de l'eucromatina durant diferents processos cel·lulars (Schultz, 2002).

INTRODUCCIÓ

KAP-1

Estructura i regulació

KAP-1 és un co-repressor transcripcional que permet iniciar i mantenir l'estructura de l'heterocromatina.

Estudis realitzats sobre el 1996 afirmen que KAP-1 pertany a la família de les proteïnes TRIM28 (transcription intermediary factor 1-beta) i està implicada en la reparació dels trencaments de doble cadena de l'ADN (DNA DBS). (Sripathy, Stevens, & Schultz, 2006).

KAP-1 conté dos dominis altament conservats: L'extrem N-terminal de KAP-1 està prescindit pel domini RBCC (Ring, B-Box, Coiled-Coil) (Iyengar & Farnham, 2011). Aquest domini promou l'homo- i l'heterooligomerització, la qual és important per l'estabilitat i la funcionalitat de moltes proteïnes TRIM. (Peng, Feldman, & Rauscher, 2002). A més a més, és capaç d'unir-se selectivament a factors de transcripció del domini KRAB. Per altra banda, l'extrem C-terminal forma un tàndem amb el domini PHD i amb un bromodomini anomenat domini PHD-Bromo (Figura 6). Aquest tàndem es troba entre els aminoàcids 618 i 835 i funciona com una unitat altament cooperativa per la regulació transcripcional, modulació de les vies de senyalització, alteració de l'estructura de la cromatina, i reparació del trencament de doble cadena de l'ADN (Schultz, Friedman, & Rauscher, 2001). No obstant, aquest domini és responsable del reclutament de modificadors de proteïnes, com són les proteïnes HP1, SETDB1 o les HDAC per tal d'induir la repressió transcripcional (Lechner, Begg, Speicher, & Rauscher, 2000; Nielsen et al., 1999). És per aquest motiu que KAP-1 està considerat un gran regulador per l'estabilitat genòmica de la formació de l'heterocromatina i el silenciament dels gens.

INTRODUCCIÓ

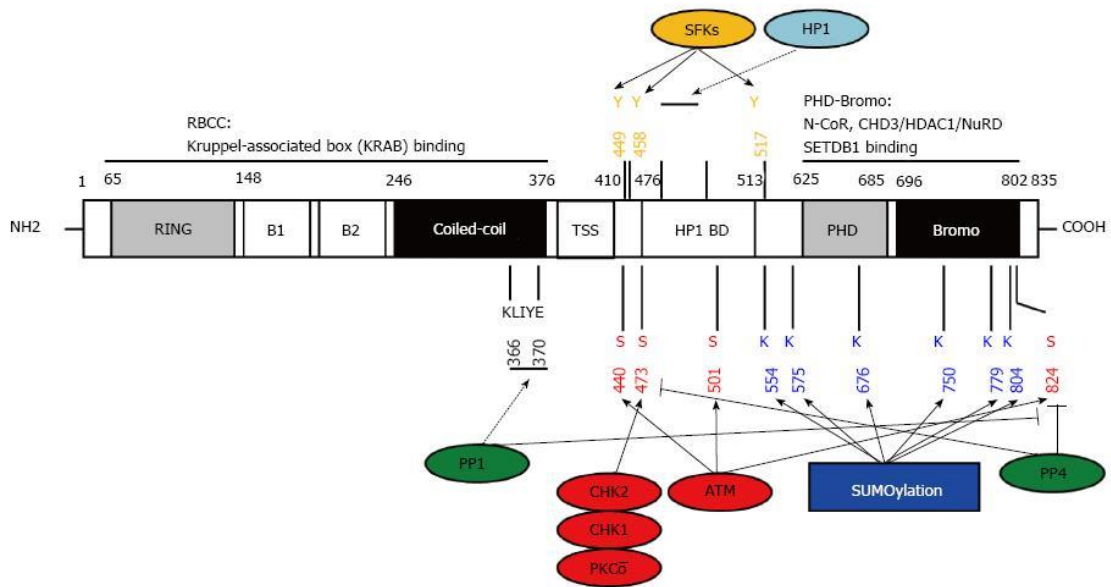


Figura 6. Dominis que defineixen la proteïna KAP-1. Domini RBCC subdividit en: Ring, B1, B2 i el Coiled-Coil a l'extrem N-terminal que interaccionen amb els factors de transcripció i el doble domini de l'extrem C-terminal; PHD i Bromo. Al centre el domini HP1 implicat en la repressió de gens.

Funcions

Les interaccions que forma KAP-1 són les que realment donen la seva funcionalitat. S'ha descrit que pot formar interaccions amb HDAC i complexes de metiltransferases d'histones, així com formar part d'un mateix complex amb proteïnes com SETDB1, entre d'altres. Aquesta característica proporciona una alta funcionalitat a la proteïna, tanmateix com, estar involucrada en la regulació transcripcional mitjançant modificacions d'histones en llocs específics.

Estudis en ratolins demostren que KAP-1 juga un paper molt important en la regulació de la diferenciació de les cèl·lules mare embrionàries i de les diferents cèl·lules adultes i, en conseqüència, en la regulació del desenvolupament tumoral i en la reparació del dany de l'ADN.

INTRODUCCIÓ

CRISPR

La tècnica CRISPR és una tècnica molt prometedora i molt novadora que ens permet editar el genoma de manera ràpida, senzilla i econòmica. Consisteix en una molècula de ARN guia (ARNg), i una endonucleasa d'ADN, Cas9 (Cong et al., 2013). A la natura els bacteris utilitzen el sistema CRISPR per defensar-se d'atacs virals. L'ARNg, determina on donaran lloc les insercions o delecions. Tanmateix, l'enzim Cas9 és l'encarregat d'introduir un tall de doble cadena per introduir els ARNg, de forma directa, a una seqüència determinada, seqüència PAM. Això succeeix un cop els ARN guia i la Cas9 s'han expressat en les cèl·lules. (Mali et al., 2013) Aquest tall pot ser reparat per una unió no homòloga dels extrems (NHEJ), el qual esdevé en la pèrdua de la proteïnes d'interès (knock-out), o bé, per una reparació homòloga directe (HDR), que permet addicionar una proteïna d'interès (knock-in) (Figura 7).

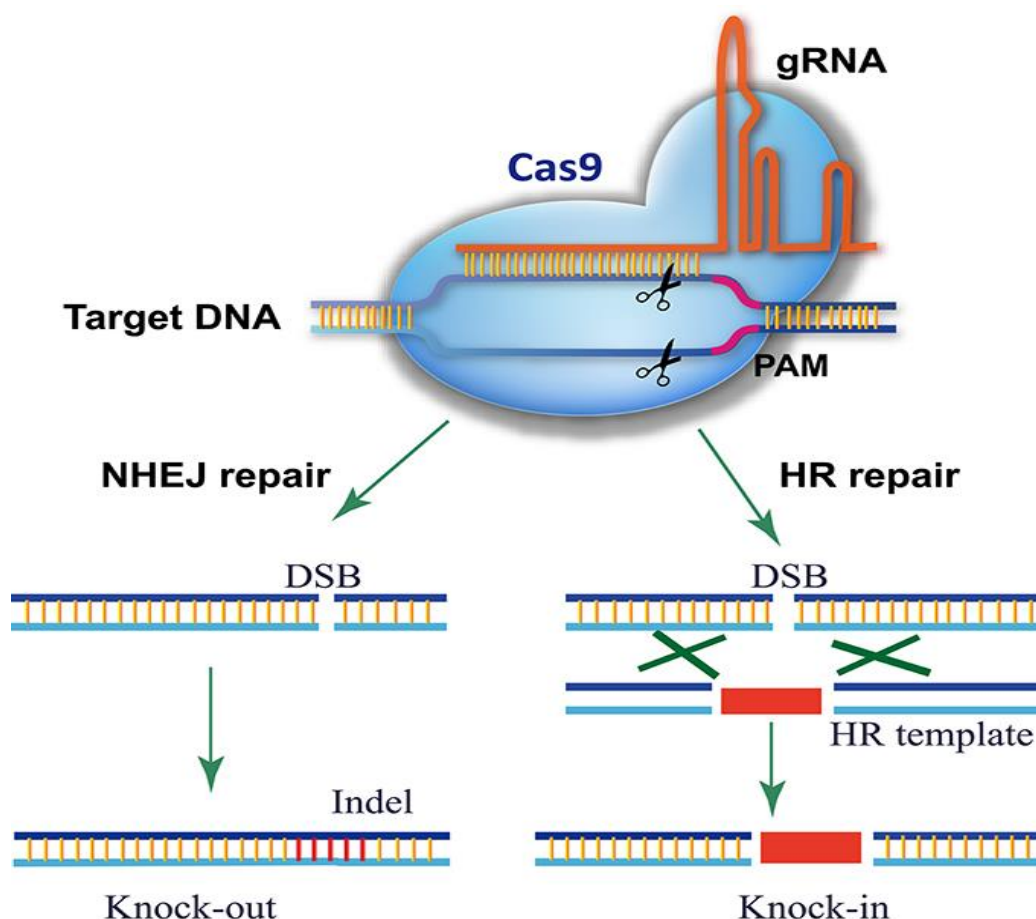


Figura 7. Metodologia de la tècnica CRISPR. Prosopacer adjacent motifs (PAM), és la seqüència que rep els talls provocats per la Cas9 i on s'insereixen els ARNg. NHEJ (non-homologous end joining), reparació no homòloga, HR (homologous repair), reparació homòloga i DSB (Double-strand break), talls de doble cadena.

ANTECEDENTS

Per desenvolupar el nostre estudi sobre la determinació d'un complex entre SirT1, SETDB1 i KAP-1 ens hem basat en experiments descrits anteriorment que ens han facilitat informació sobre els diferents complexos que formen les nostres proteïnes d'interès entre elles: SirT1-KAP-1 i SETDB1-KAP-1.

Complex SirT1 – KAP-1

La recombinació homòloga (HR) i la recombinació no homòloga (NHEJ) són dues vies de reparació dels trencaments de doble cadena de l'ADN (DSB) i la cèl·lula ha de mantenir la regulació entre ambdues vies. Mentre la HR requereix d'una seqüència homòloga per reparar els danys, la lesió de l'ADN en la NHEJ es lliga directament i per tant hi ha un alt risc de perdre nucleòtids. Per aquest motiu, la regulació que fa la cèl·lula entre les dues vies s'ha convertit en un dels objectius importants per la investigació molecular degut a que permet mantenir la integritat genòmica amb el temps.

Estudis recents de (Lin et al., 2015) demostren que KAP-1 juga un paper clau en el balanç entre aquestes vies de reparació de DSB mitjançant la inhibició de la via de HR i promovent la reparació per la NHEJ. Els autors de l'article descriuen que la desacetilació de KAP-1 per part de SirT1 afavoreix la reparació a través de NHEJ ja que s'estabilitza la interacció de KAP-1 amb 53BP1, factor clau en la reparació NHEJ. Així doncs, el nostre estudi suggereix un mecanisme regulador per la reparació de HR-NHEJ.

Adicionalment altres estudis també mostren el paper, directe o indirecte, de SirT1 en el procés de reparació de l'ADN, fet que confirma que les dues proteïnes, SirT2 KAP-1, poden jugar un paper molt important en la reparació de l'ADN, conjuntament (Jeong et al., 2007; W. Zhang et al., 2016)

Complex SETDB1 – KAP-1

Els experiments fets per (Schultz, 2002) demostren que SETDB1 i KAP-1 formen part d'un complex funcional molt important en el silenciament de gens presents a l'eucromatina. Schultz et al. 2002 descriuen que KAP-1, co-repressor de la superfamília de KRAB-ZFP, s'uneix a SETDB1 i porta a SETDB1 als promotors dels gens transcripcionalment silenciats pels repressors KRAB.

A la vegada, els autors descriuen aquest complex funcional de KAP-1 i SETDB1 també hi formaria part HP1, factor clau en la formació de la cromatina compactada o silenciada. Així doncs, quan aquest complex es localitza en el promotor de certs gens aquests són silenciats per l'acció d'aquest macro complex KRAB-KAP-1. Descriuen que KAP-1 faria de plataforma que aglutinaria diferents repressors que serien portats a gens diana per

ANTECEDENTS

KRAB-SFPs on tindria lloc la metilació d'histona H3K9 i la deposició d'HP1 resultant en un silenciament de l'expressió gènica.

Veien que totes tres proteïnes tenen una gran implicació en la regulació de l'estructura de la cromatina i la regulació de l'expressió gènica, i el fet que KAP-1 interaccioni amb SirT1 i SETDB1 ens planteja la hipòtesi de que potser les tres proteïnes podrien estar formant un complex funcional. Per aquest motiu ens proposem fer un estudi per tal de correlacionar SirT1, SETDB1 i KAP-1.

Interaccionen SirT1 i SETDB1? Formen un complex implicat en la regulació de la cromatina SirT1, SETDB1 i KAP-1?

RESULTATS

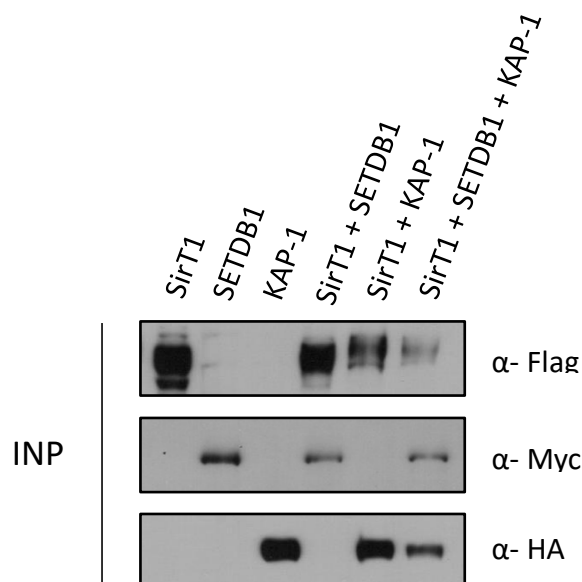
1. Complex SirT1 / SETDB1 / KAP-1

Segons els estudis realitzats en l'última dècada, sabem que SirT1 té una important interacció amb KAP-1 i aquesta última, independentment, interacciona amb SetDB1. Totes tres s'ha comprovat que presenten un rol important en la formació i regulació de l'heterocromatina. L'objectiu que ens proposem és determinar si les tres proteïnes formen part d'un complex funcional.

Amb aquest objectiu, ens hem centrat en una primera part en comprovar l'expressió de les diferents proteïnes clonades i la interacció, ja descrita. Més endavant, ens proposem aprofundir en aquest joc de rols i estudiar les connexions entre SirT1, SETDB1 i KAP-1 per tal de poder determinar si les tres conformen un complex, o bé, si les interaccions es troben en dos complexos diferents.

Co-expressió de les proteïnes clonades

Amb aquest objectiu, es varen transfectar cèl·lules HeLa amb els plàsmids que contenen les proteïnes d'interès clonades. Els resultats obtinguts, mostrats a la Figura 8, van determinar que totes tres proteïnes s'expressaven en cèl·lules HeLa, ara bé, l'expressió de SETDB1 concretament veiem que és inferior respectes les altres dues i que això ens pot significar un problema a l'hora de determinar la interacció entre proteïnes. Per altra banda, quan observem el WB veiem que hi ha una observació molt significant: una davallada en l'expressió de KAP-1 en presència de SETDB1, això indicaria que SETDB1 podria estar regulant d'alguna manera els nivells d'expressió de la proteïna KAP-1.



RESULTATS

Figura 8. Expressió de les proteïnes clonades. Western blot de cèl·lules HeLa transfectades amb els factors indicats i amb els seus respectius anticossos: SirT1 amb α -Flag, SETDB1 amb α -Myc i KAP-1 amb α -HA.

Interacció entre SirT1 / SETDB1 / KAP-1

Per seguir amb el nostre estudi, vam confirmar les interaccions ja descrites anteriorment. Les interaccions de les diferents proteïnes es van estudiar en condicions normals i en condicions d'estrès oxidatiu ja que tal i com hem comentat anteriorment les nostres proteïnes d'interès s'ha descrit que juguen un paper important com a sensors metabòlics i en reparació.

Un cop vist que totes tres proteïnes tenen una bona i àmplia expressió en les cèl·lules HeLa, els resultats de la IP ens permet confirmar l'existència d'interacció entre SirT1 i KAP-1, amb i sense estrès. Cal destacar, que en condicions d'estrès, quan les cèl·lules estan tractades amb H_2O_2 la interacció SirT1-KAP-1 augmenta molt considerablement, que, segons el nostre coneixement, no ha estat comprovat ni descrit fins ara (Figura 9).

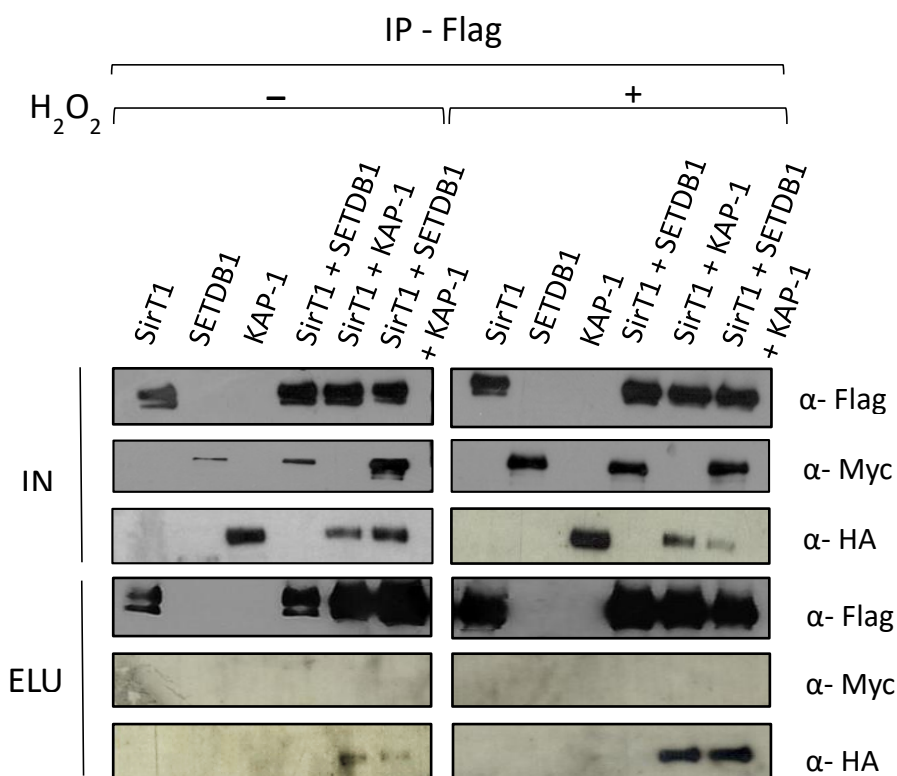


Figura 9. Interacció i regulació dels nivells de SirT1, SetDB1 i KAP-1 sense estrès i en condicions d'estrès. Western blot de les cèl·lules HeLa transfectades amb Flag-SirT1, Myc-SETDB1 i KAP-1-HA i fent una immunoprecipitació de les proteïnes amb reïna Flag (IP-Flag) amb estrès (+ H_2O_2) i sense estrès (- H_2O_2).

RESULTATS

A l'hora de fer la IP amb les proteïnes expressades en HeLa ens vam plantejar que degut a la baixa expressió de myc-SETDB1 que s'observava potser ens seria difícil detectar la interacció amb les proteïnes SirT1 i KAP-1. Per aquesta raó vam repetir els experiments amb una altra línia cel·lular humana diferent en la qual l'expressió de proteïnes vàrem veure que augmentava considerablement, les cèl·lules HEK293F.

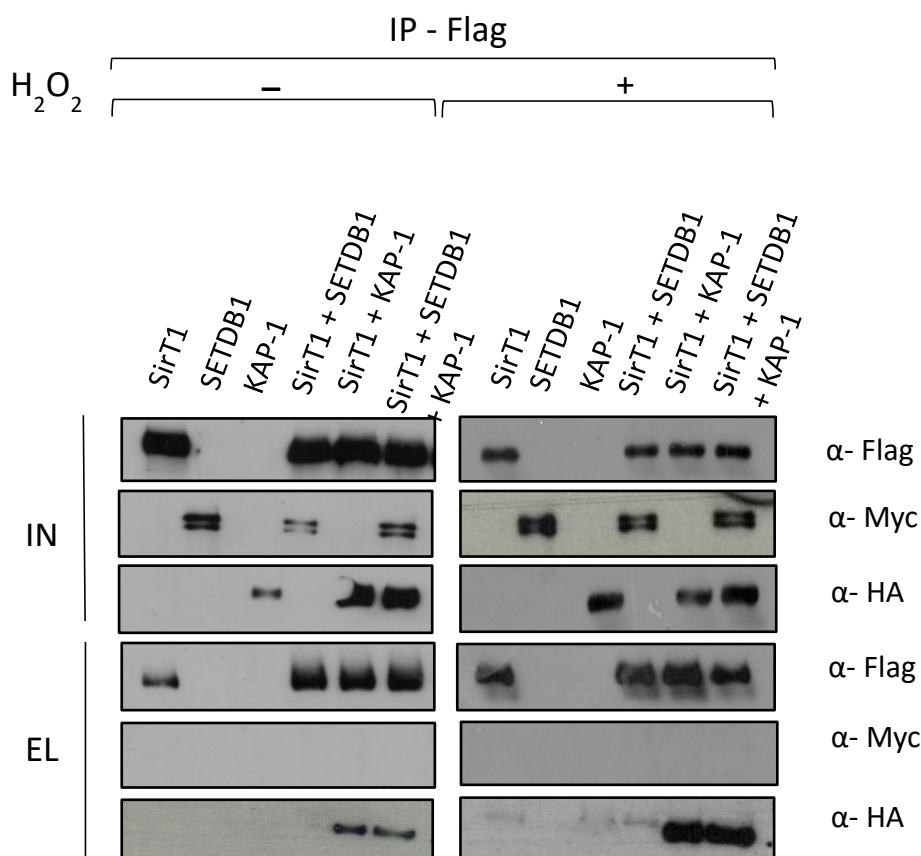


Figura 10. Interacció i regulació dels nivells de SirT1, SETDB1 i KAP-1 sense estrès i en condicions d'estrès. Western blot de la IP, tractada amb reïna Flag, de cèl·lules 293 transfectades amb Flag-SirT1, Myc-SETDB1 i KAP-1-HA sense condicions d'estrès i amb condicions d'estrès.

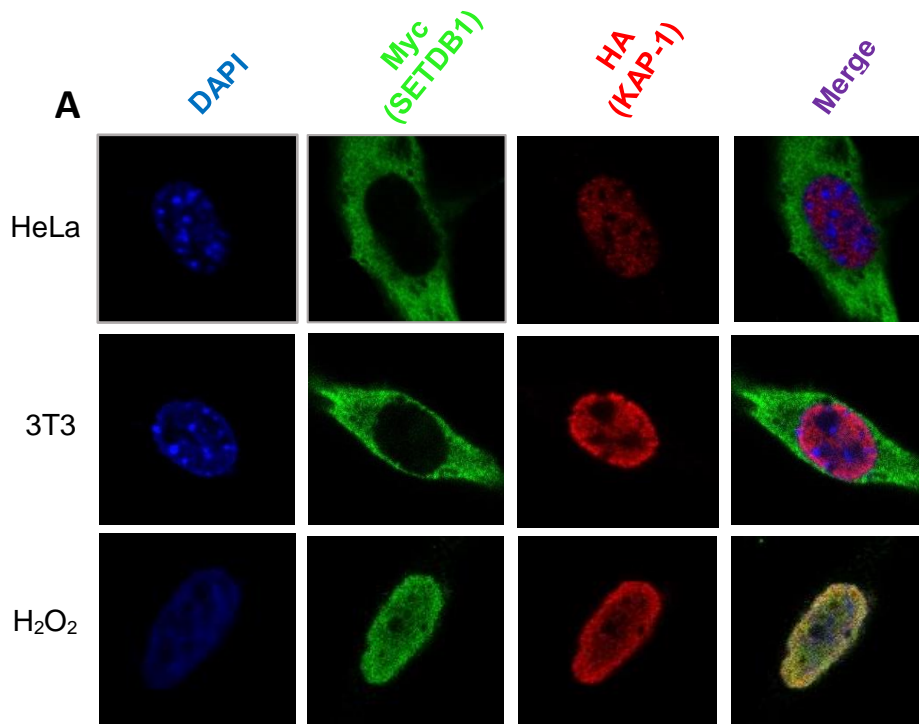
En cèl·lules HEK293F tornem a confirmar la interacció entre SirT1 i KAP-1 ja esmentada (Figura 10), però tot i millorar els nivells d'expressió de myc-SETDB1 no ens ha estat possible determinar la interacció entre SETDB1 i SirT1.

Finalment, tot i que les dades no es mostrin en el treball perquè no presenten cap diferència significant i la interacció ja està descrita, hem observat la interacció entre SETDB1 i KAP-1, amb i sense estrès.

RESULTATS

Co-localització de les proteïnes clonades

Una altra qüestió que volíem abordar era la localització cel·lular de les nostres proteïnes d'estudi. S'ha descrit que SirT1 i KAP-1 són, generalment, proteïnes nuclears (Figura 11C), tal i com nosaltres observem per IF. En el cas de SETDB1 s'ha descrit que la proteïna endògena es localitza al nucli però que la sobre-expressió de la proteïna, degut al fet que els nivells d'expressió cel·lular d'aquesta estiguin altament regulats, fa que aquesta es localitzi de forma abundant al citoplasma (Figura 11A i 11B). Ens plantejem si aquest canvi de localització és el causant de no haver pogut observar la interacció existent entre les dues proteïnes, ja que estan localitzades en regions cel·lulars diferents i això dificulta la detecció del possible complex i la seva funcionalitat.



RESULTATS

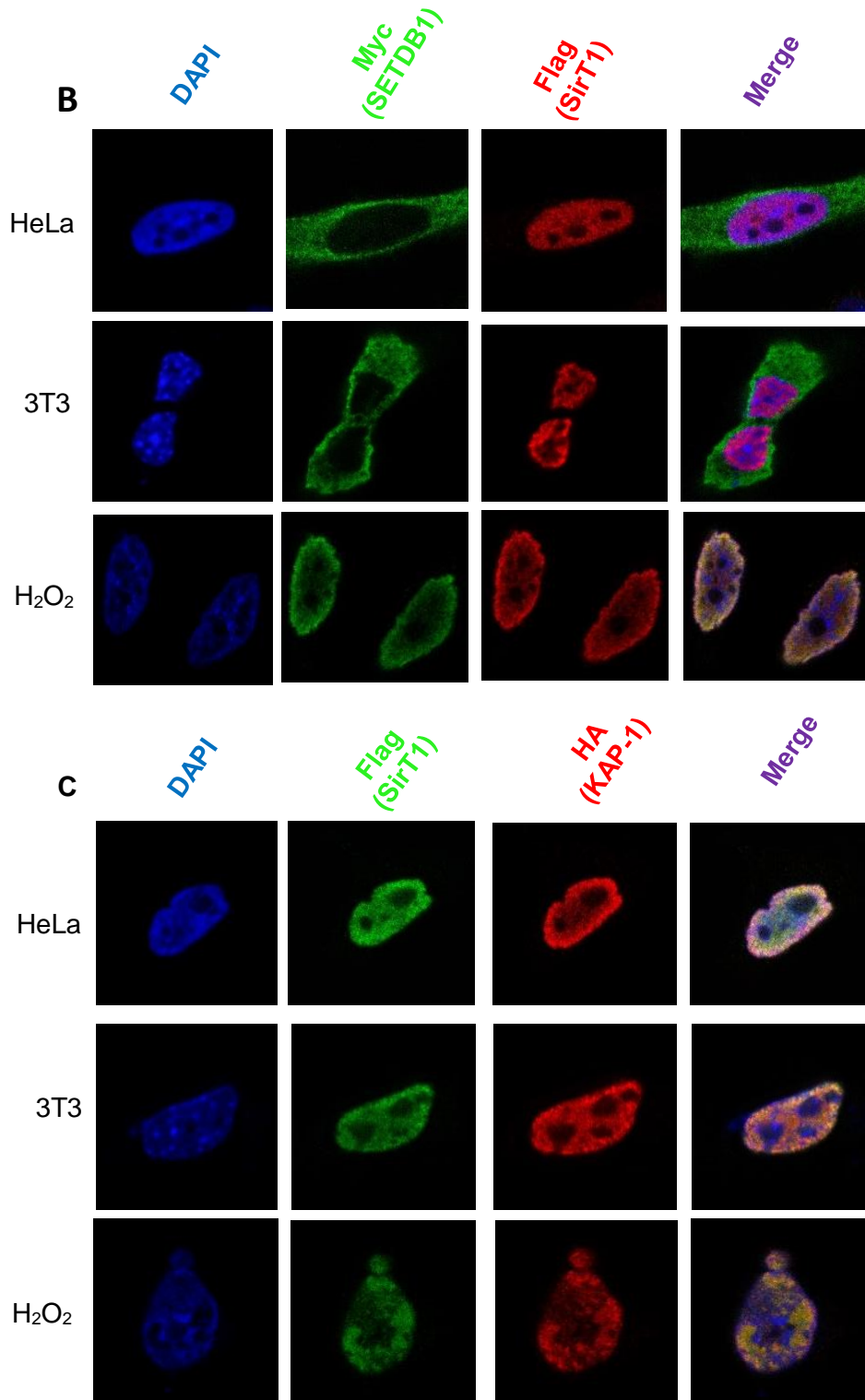


Figura 11. SirT1, SETDB1 i KAP-1 co-localitzen en regions diferents. Cèl·lules HeLa i NIH3T3 transfectades per expressar SirT1, SETDB1 i KAP-1. Anticossos primaris utilitzats; α -Flag, α -Myc i α -HA. Anticossos secundaris; α -Mouse Alexa Flour 488 (verd) i α -Rabbit Alexa Four 555 (vermell). El DAPI ens fa un pla de totes les cèl·lules, i el Merge, ens mostra la correlació entre les proteïnes que s'estudien a cada cas.

RESULTATS

Al veure que SETDB1 tenia una localització majoritàriament citoplasmàtica en condicions normals ens vam plantejar estudiar la localització de SETDB1 en condicions d'estrès oxidatiu. Tal i com es comprova a la Figura 11 (H_2O_2) sota condicions d'estrès SETDB1 varia de regió, essent clara i indiscutiblement nuclear. Això ens va portar a plantejar-nos la detecció del complex funcional entre SirT1, SETDB1 i KAP-1 en condicions d'estrès.

Detecció del complex SirT1, SETDB1 i KAP-1

Per tal de determinar si les proteïnes d'interès co-fraccionen en un mateix complex en condicions normals o d'estrès vàrem realitzar una columna d'exclusió molecular per FPLC. Mitjançant aquesta columna de cromatografies de l'extracte cel·lular vam obtenir diferents fraccions corresponents a pesos moleculars diferents, en un volum de 200µl/ependorf. Es van obtenir unes 70 mostres en total, de les quals en vam seleccionar les més determinants pel nostre estudi; des de l'inici del fraccionament, passant per el co-fraccionament de les tres proteïnes, als voltants de 670 KDa, i finalment estudiant la davallada d'expressió d'aquestes.

Sabem que la fracció 28 indica l'inici de fraccionament de les proteïnes, la fracció 45 correspon a 670 KDa, la fracció 50 a 450 KDa, la fracció 55 a 200 KDa i, per últim, la fracció 60 a 75 KDa. Sabent aquestes mesures estudiem el co-fraccionament de les nostres proteïnes:

SirT1 i KAP-1 tenen un pes molecular als voltants dels 100KDa, i són un trímer i un dímer, respectivament. En canvi, SETDB1 és un monòmer amb pes molecular de 170 KDa aproximadament. Per tant, d'acord amb els resultats presentats a la Figura 12, corroborarem que SirT1, SETDB1 i KAP-1 co-fraccionen perquè s'observa expressió de totes tres als voltants de la fracció 45 (670 KDa). Si fem els càlculs pertinents, veurem que correspon amb el pes molecular esperat (Figura 12).

RESULTATS

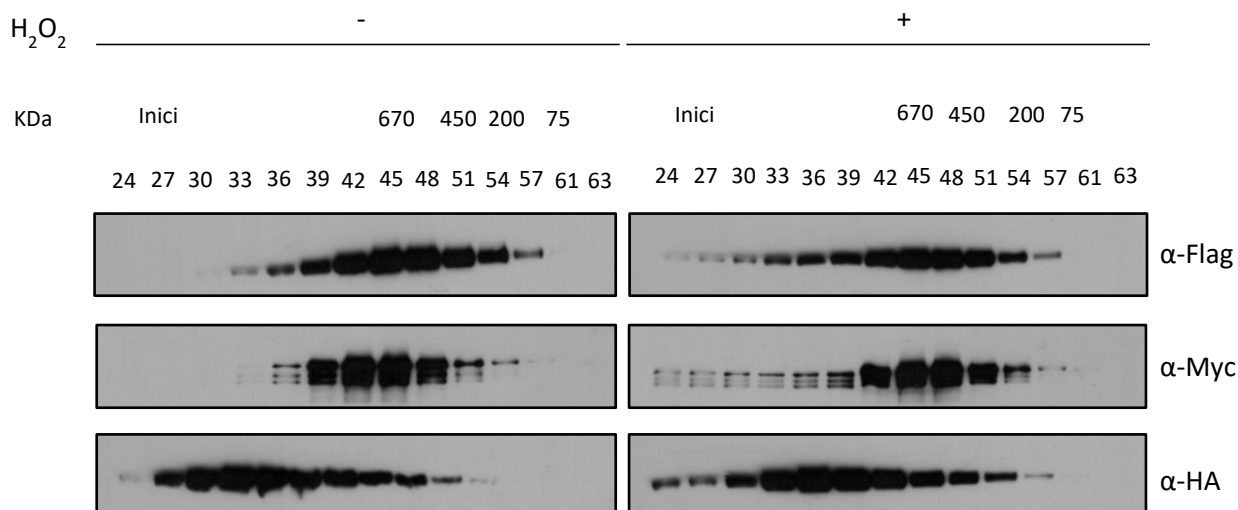
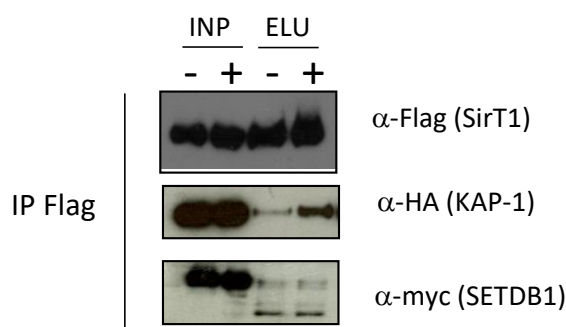


Figura 12. Co-fraccionament de SirT1, SetDB1 i KAP-1. Cèl·lules HEK293F transfectades amb SirT1, SETDB1 i KAP-1 sense condicions d'estrès oxidatiu (-H₂O₂) i amb condicions d'estrès oxidatiu (+H₂O₂). Anticossos utilitzats: α-Flag per SirT1, α-Myc per SETDB1 i α-HA per KAP-1.

Després de comprovar que les tres proteïnes co-fraccionen, mitjançant un WB, ara volem determinar si interaccionen, si formen realment un complex. Amb aquesta finalitat fem una IP de les fraccions en que co-fraccionen.

Els resultats de la IP a la Figura 13, ens demostren clarament que hi ha una forta interacció entre SirT1 i les altres dues proteïnes estudiades, SETDB1 i KAP-1. Per una banda, en el cas de SirT1 i KAP-1, una interacció ja obtinguda en resultats anteriors, seguim veient que en situacions d'estrès oxidatiu la interacció entre ambdues proteïnes és molt més intensa. Per altra banda, cal remarcar l'observació d'interacció entre SirT1 i SETDB1 ja que no ha estat vista en aquest estudi fins el moment. Aquesta interacció no sembla presentar diferències significants en presència o no d'estrès oxidatiu. Per altra banda, no podem determinar l'existència d'un complex funcional entre SirT1, KAP-1 i SETDB1.



RESULTATS

Figura 13. Nivells d'interacció entre les tres proteïnes en el co-fraccionament. Western blot de la immunoprecipitació de l'extracte total de cèl·lules HEK293F transfectades amb SirT1, SETDB1 i KAP-1, totes elles marcades mitjançant reïna FLAG i tractades amb els anticossos indicats.

2. CRISPR

Després de veure que SirT1, SETDB1 i KAP-1 sobre-expressades co-fraccionen en una mateixa fracció, tot i que no hem pogut determinar que formin un complex funcional, ens plantegem la repercussió d'inactivar la funció del gen *sirt1* en la interacció i regulació d'aquestes proteïnes. Tot i que hem comprovat que SETDB1 interacciona també amb SirT1 i KAP-1, no ens plantegem fer SETDB1 knock-out perquè no és viable per la cèl·lula.

Tot i no poder anar més enllà, per falta de temps, i veure realment que succeeix quan aquest gen no s'expressa, si que s'han pogut obtenir clons knock-out per la proteïna SirT1 en una línia cel·lular de ratolí (NIH3T3). No obstant, en HeLa no hem obtingut clons amb la deleció de SirT1, però si que hem observat la transfecció i el desenvolupament de clons positius per GFP.

Disseny dels ARNg

Cal assegurar-se que el disseny dels ARN guia és el més adequat, per aquest motiu seleccionem els exons que són comuns en totes les variants. Per part de SirT1 humà l'exó 5 (score 83) i l'exó 6 (score 77), que es realitzarà en HeLa i per SirT1 de ratolí l'exó 1 (score 98) i l'exó 3 (score 98), que es realitzarà en les cèl·lules NIH3T3 (Figura 1 Annex).

SirT1 Humà

- ARNg 1: Exó 5

5'... AACAGGTTGCGGGAATCCA...-3'

- ARNg 2: Exó 6

5'...GTTGACTGTGAAGCTGTACG...3'

SirT1 Ratolí

- ARNg 1: Exó 1

5'...CGGACGAGCCGCTCCGCAAG...3'

RESULTATS

- ARNg 2: Exó 3

5'...TATCTATGCTCGCCTTGCGG...3'

Clonatge dels ARNg i seqüenciació del vector.

En primer lloc fem el clonatge dels ARNg en el vector de la Cas9 (PX458) (Figura 2 Annex). Obtenim diferents colònies provinents dels diferents clonatges que seqüenciem i per tal de descartar qualsevol possible error provinent del clonatge. Escollim un clonatge per a cada ARNg.

Formació de clons positius

Posteriorment fem la transfecció del plàsmid seleccionat per cada ARNg i la combinació dels dos plàsmids amb ARNg en les línies cel·lulars escollides. S'ha utilitzat un marcador fluorescent, GFP, el qual es troba introduït en el plàsmid com a mètode d'identificació de les cèl·lules transfectades (Figura 14). Per microscòpia de fluorescència hem comprovat que els percentatges de transfecció són elevats, ja hem observat que la majoria de les cèl·lules expressen el GFP contingut en el vector, per tant podem categoritzar els clons com a clons positius.

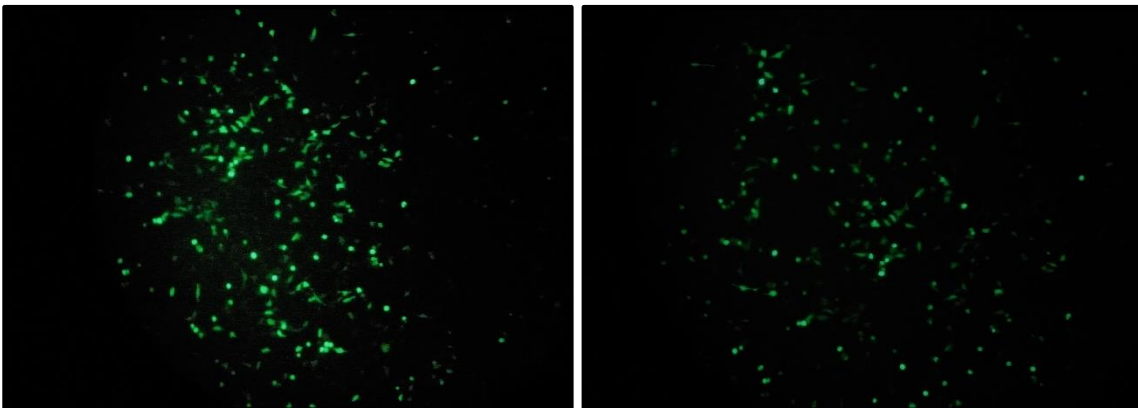


Figura 14. Clonatge dels ARNg en el vector. Observació, amb un microscopi de fluorescència, del marcador GFP (verd) expressat per les cèl·lules clonades correctament amb el vector PX458.

RESULTATS

Determinació de clons positius

Després d'observar que tenim una gran quantitat de cèl·lules transfectades, vam anar al Sorter, on ens van separar, utilitzant el marcador GFP, en una placa de 98 pous, una cèl·lula positiva per GFP per pou per tal de poder obtenir clons i determinar l'expressió de SirT1.

Les imatges de la Figura 3 de l'Annex ens determinen les zones més idònies per la selecció de les nostres cèl·lules. Cal prestar molta atenció amb la selecció de les cèl·lules, perquè no totes presenten un mateix grau de positivitat, per tant cal evitar possibles errors i escollir les zones més aptes. Dins dels requadres indicats hi trobem les cèl·lules seleccionades que van ser repartides una a cada pou de la placa i per tant, les cèl·lules d'on provenen els nostres clons.

És important seleccionar aquells clons provinents d'una sola cèl·lula, és per això que deixem créixer les cèl·lules durant uns dies per veure com evolucionen i són capaces de desenvolupar-se (Figura 15). En aquest cas, hem obtingut una gran quantitat de clons sobretot de cèl·lules HeLa. Al llarg del període hem arribat a observar més de 15 clons provinents de cèl·lules HeLa, però, malauradament, només 3 provinents de les cèl·lules 3T3.

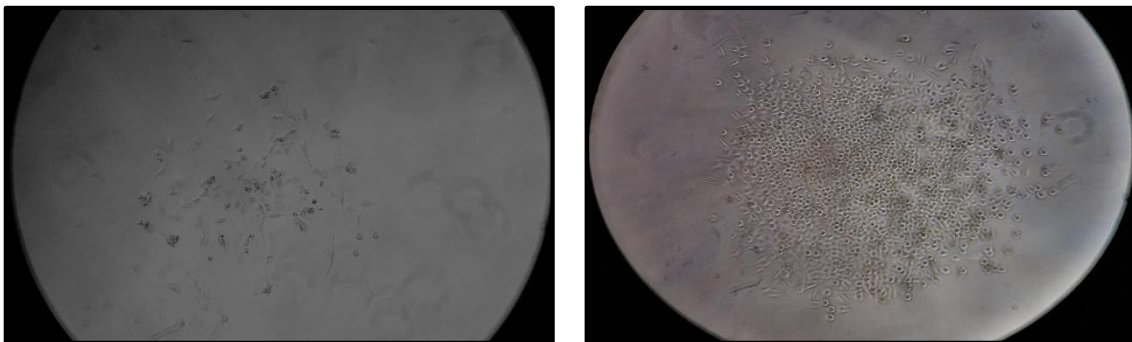


Figura 15. Clons en fase de desenvolupament. Fotografia realitzada mitjançant un microscopi electrònic del creixement cel·lular en forma de clon originats d'una única cèl·lula independentment, tant en les cèl·lules 3T3, a l'esquerre, com en HeLa, a la dreta.

Tot i així, cal remarcar que tot i la gran quantitat de clons de HeLa observats l'únic clon realment positiu obtingut, és a dir, l'únic clon que realment és SirT1 knock-out i per tant no expressa la nostra proteïna d'interès ha estat un clon de les cèl·lules NIH3T3 (Figura 16).

RESULTATS

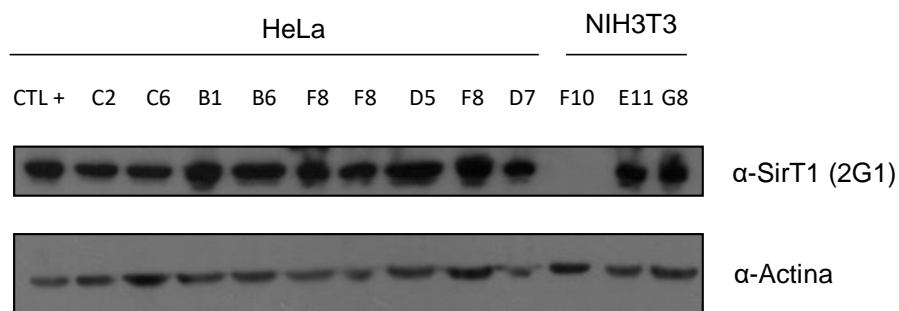


Figura 16. Determinació dels clons SirT1 knock-out. Western blot del clonatge de les cèl·lules HeLa i NIH3T3 SirT1 knock-out. S'utilitza l'anticòs contra proteïnes endògenes 2G1 (α -SirT1) i l' α -Actina per observar la Actina com a control quantitatiu. Els noms de les diferents columnes els hem determinat nosaltres per identificar la procedència de cada clon.

DISCUSSIÓ DE RESULTATS

L'objectiu d'aquest treball ha estat determinar si les proteïnes SirT1, SETDB1 i KAP-1 formen un complex funcional i veure quina implicació pot tenir en la regulació de la cromatina. Veient les implicacions d'aquestes proteïnes en reparació i en el control de l'expressió gènica i regulació de la cromatina en condicions d'estrès, hem estudiat el complex en condicions normals i d'estrès. El nostre treball suggereix que SirT1 pot tenir un paper clau en la regulació de les altres dues proteïnes d'interès en el seu paper en la regulació de la cromatina.

1. Complex funcional SirT1 – SETDB1 – KAP-1.

A través d'estudis d'expressió i IP confirmem la interacció ja descrita entre SirT1 i KAP-1. Veiem que interaccionen en condicions normals i veiem que aquesta interacció incrementa en condicions d'estrès oxidatiu. Tot i que s'ha descrit que aquestes dues proteïnes actuen coordinadament en la reparació de DSB, no s'havia descrit anteriorment aquest clar augment d'interacció entre elles en condicions d'estrès. Aquesta observació ens porta a pensar que possiblement aquestes proteïnes juguen un paper clau en la reparació de DSB.

Per altra banda, la interacció de SETDB1 i KAP-1 ja descrita i també observada en els nostres estudis, ens confirma que tenen una relació de funcionalitat com a complex de repressió gènica. Estudis anteriors mostren que KAP-1 actua com a co-repressor, per reclutar enzims, com és SETDB1, amb la finalitat que l'enzim reclutat porti a terme les seves activitats enzimàtiques en el lloc adequat i promoure la repressió gènica.

Tal i com afirmen els estudis sobre SETDB1, SETDB1 endogen es localitza completament en el nucli on té els nivells d'expressió altament regulats, ara bé al treballar amb proteïnes sobre-expressades, com és el nostre cas, hem vist que hi ha una proteòlisi i una translocació de SETDB1 al citoplasma. És per aquest motiu que tot i haver comprovat la interacció entre SETDB1 i KAP-1, cal dir que només s'ha observat en condicions d'estrès, mentre que en condicions normals, no s'ha observat interacció entre SETDB1 i KAP-1. Aquests resultats, ens suggereixen que no veure interacció entre aquestes dues proteïnes pot ser degut al fet d'utilitzar proteïnes sobre-expressada i per tant de la translocació de SETDB1 al citosol que s'observa a la IF. No obstant, quan SETDB1 està sota condicions d'estrès oxidatiu la seva localització torna a ser totalment nuclear, igual que KAP-1, podent-se donar la interacció i, això, justificaria els resultats observats d'interacció SETDB1-KAP-1 en condicions d'estrès.

El fet de que SETDB1 sobre-expressat es localitzi al nucli en condicions d'estrès, ens indica que sota condicions d'estrès possiblement el requeriment de la proteïna al nucli

DISCUSSIÓ DE RESULTATS

és molt major i segurament necessària pel control de l'expressió gènica de gens relacionats amb estrès. Aquest fet no descrit anteriorment ens podrien servir per un futur plantejar-nos nous experiments sobre les implicacions d'aquest canvi de localització de SETDB1 en la regulació de la cromatina, el manteniment de la integritat genòmica i la regulació d'expressió gènica.

Adicionalment, també hem pogut observar que la proteïna SETDB1 regula d'alguna manera l'expressió de KAP-1. Hem observat que en presència de SETDB1 l'expressió de KAP-1 pateix una davallada indicant-nos que, d'una manera o altra, regula aquest co-repressor negativament, en condicions normals i d'estrès. Aquesta observació no s'havia descrit anteriorment i seria interessant aprofundir en la regulació entre aquestes dues proteïnes.

Finalment, després d'estudiar els resultats obtinguts a les IPs i a les IFs i veure que realment no podem determinar que les tres proteïnes interaccionen, vam realitzar un co-fraccionament per FPLC. Els resultats ens indiquen que SirT1, SETDB1 i KAP-1 co-fraccionen en fraccions de 670 KDa aproximadament. Després de seleccionar les fraccions d'interès del co-fraccionament vàrem realitzar una IP de SirT1 i vàrem veure que SirT1 en aquestes fraccions està interaccionant tant amb SETDB1 com amb KAP-1. La interacció de SirT1 i KAP-1 es veu augmentada en condicions d'estrès i la interacció de SirT1 i SETDB1 no sembla dependre de l'estrès oxidatiu. Aquests resultats ens portarien a pensar que les tres proteïnes no formen part d'un complex funcional sinó que interaccionen dos a dos. Faltaria, però, realitzar més estudis per veure realment si les interaccions són independents i si es regulen per separat, o bé, KAP-1 si que recluta els dos enzims a la vegada per tenir una funcionalitat conjunta.

Amb aquest estudi no hem confirmat el nostre objectiu de determinar que les nostres proteïnes d'interès formin un complex funcional, ara bé, ens ha permès obtenir nous resultats molt interessants per la regulació i funcionalitat de SirT1, SETDB1 i KAP-1 i, per l'estudi de la regulació de la cromatina. Així doncs, aquest treball obre nous horitzons per la biologia molecular i nous camins a emprendre per avançar en la investigació sobre la interacció d'aquestes proteïnes involucrades en la formació i regulació de la cromatina, i conseqüentment avançar en l'estudi de les malalties provocades per aquesta regulació, com són el càncer i les malalties neurodegeneratives.

2. CRISPR

Paral·lelament, tot i no poder demostrar finalment la funcionalitat del complex, degut a que no s'ha fet una determinació clara del mateix, vam aconseguir un dels nostres objectius, obtenir un clon knock-out per SirT1. Tot i desenvolupar-se el quàdruple de

DISCUSSIÓ DE RESULTATS

clons de HeLa que de NIH3T3, el clon amb la deleció de SirT1 ha estat en cèl·lules NIH3T3.

Per falta de temps, no hem pogut continuar amb el projecte i veure que passa amb el possible complex entre SirT1, SETDB1 i KAP-1, i la funcionalitat que aquest tindria quan SirT1 no s'expressa, però si que creiem que el fet d'obtenir aquesta línia KO de SirT1 ens ha de suposar una gran avantatge per l'estudi.

En el cas de l'obtenció d'una línia HeLa KO per SirT1, proposaríem realitzar nous experiments, on comprovaríem els ARNg, o bé, en seleccionariem uns de nous amb un score més elevat i repetiríem el procés de clonatge i comprovació.

CONCLUSIONS

- Les cèl·lules HEK293F ha resultat presentar millors nivells d'expressió de les proteïnes clonades SirT1, SETDB1 i KAP-1 i són les que han estat escollides per fer l'estudi de eco-fraccionament.
- En condicions normals i d'estrès s'observa més interacció entre SirT1 i KAP-1 que SirT1 i SETDB1.
- En condicions d'estrès la interacció SirT1-KAP-1 augmenta, possiblement poder portar-se a terme la reparació de dany de l'ADN a través del complex funcional descrit prèviament.
- La sobre-expressió de SETDB1 resulta en la deslocalització d'aquesta en el citosol. Aquest fet podria ser la raó per la qual ens ha costat molt determinar la interacció d'aquesta proteïna amb KAP-1 i SirT1.
- El co-fraccionament de SirT1, SETDB1 i KAP-1, ens mostra interacció entre SirT1 i SETDB1 i, SirT1 i KAP-1, però, no podem concloure que es trobin formant un complex funcional.
- Les cèl·lules knock-out per SirT1 que s'han obtingut poden significar un gran avenç en l'estudi de les relacions funcionals entre aquestes tres proteïnes i la regulació de la cromatina en general.

BIBLIOGRAFIA

- Allis, C. D., Jenuwein, T., Reinberg, D., & Caparros, M.-L. (2007). Chromatin Modifications and Their Mechanism of Action. In *Epigenetics* (First Edit, pp. 191–209). New York: John Inglis.
- Bolderson, E., Savage, K. I., Mahen, R., Pisupati, V., Graham, M. E., Richard, D. J., ... Khanna, K. K. (2012). Kruppel-associated Box (KRAB)-associated co-repressor (KAP-1) Ser-473 phosphorylation regulates heterochromatin protein 1 β (HP1- β) mobilization and DNA repair in heterochromatin. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(33), 28122–31.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.368381>
- Bosch-Presegué, L., & Vaquero, A. (2015). Sirtuin-dependent epigenetic regulation in the maintenance of genome integrity. *The FEBS Journal*, *282*(9), 1745–67. <https://doi.org/10.1111/febs.13053>
- Cantó, C., & Auwerx, J. (2012). Targeting sirtuin 1 to improve metabolism: all you need is NAD(+)? *Pharmacological Reviews*, *64*(1), 166–87.
<https://doi.org/10.1124/pr.110.003905>
- Cho, S., Park, J. S., & Kang, Y.-K. (2013). Regulated nuclear entry of over-expressed Setdb1. *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, *18*(8), 694–703. <https://doi.org/10.1111/gtc.12068>
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., ... Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science (New York, N.Y.)*, *339*(6121), 819–23.

BIBLIOGRAFIA

<https://doi.org/10.1126/science.1231143>

Dang, W. (2014). The controversial world of sirtuins. *Drug Discovery Today*.

Technologies, 12, e9–e17. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2012.08.003>

DesJarlais, R., & Tummino, P. J. (2016). Role of Histone-Modifying Enzymes

and Their Complexes in Regulation of Chromatin Biology. *Biochemistry*,

55(11), 1584–99. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01210>

Ivy, J. M., Klar, A. J., & Hicks, J. B. (1986). Cloning and characterization of four

SIR genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*,

6(2), 688–702. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3023863>

Iyengar, S., & Farnham, P. J. (2011). KAP1 protein: an enigmatic master

regulator of the genome. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(30),

26267–76. <https://doi.org/10.1074/jbc.R111.252569>

Jeong, J., Juhn, K., Lee, H., Kim, S.-H., Min, B.-H., Lee, K.-M., ... Lee, K.-H.

(2007). SIRT1 promotes DNA repair activity and deacetylation of Ku70.

Experimental & Molecular Medicine, 39(1), 8–13.

<https://doi.org/10.1038/emm.2007.2>

Kang, H., Oka, S., Lee, D.-Y., Park, J., Aponte, A. M., Jung, Y.-S., ... Chung, J.

H. (2017). Sirt1 carboxyl-domain is an ATP-repressible domain that is

transferrable to other proteins. *Nature Communications*, 8, 15560.

<https://doi.org/10.1038/ncomms15560>

BIBLIOGRAFIA

- Karanth, A. V., Maniswami, R. R., Prashanth, S., Govindaraj, H., Padmavathy, R., Jegatheesan, S. K., ... Rajagopal, S. (2017). Emerging role of SETDB1 as a therapeutic target. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 21(3), 319–331. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1279604>
- Kondo, A., Goto, M., Mimura, T., & Matsubara, M. (2016). Silent information regulator T1 in aqueous humor of patients with cataract. *Clinical Ophthalmology*, 10, 307. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S100213>
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>
- Kramer, J. M. (2013). Epigenetic regulation of memory: implications in human cognitive disorders. *Biomolecular Concepts*, 4(1), 1–12. <https://doi.org/10.1515/bmc-2012-0026>
- Lechner, M. S., Begg, G. E., Speicher, D. W., & Rauscher, F. J. (2000). Molecular determinants for targeting heterochromatin protein 1-mediated gene silencing: direct chromoshadow domain-KAP-1 corepressor interaction is essential. *Molecular and Cellular Biology*, 20(17), 6449–65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10938122>
- Lin, Y.-H., Yuan, J., Pei, H., Liu, T., Ann, D. K., & Lou, Z. (2015). KAP1 Deacetylation by SIRT1 Promotes Non-Homologous End-Joining Repair. *PloS One*, 10(4), e0123935. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123935>
- Maksakova, I. A., Thompson, P. J., Goyal, P., Jones, S. J., Singh, P. B., Karimi,

BIBLIOGRAFIA

- M. M., & Lorincz, M. C. (2013). Distinct roles of KAP1, HP1 and G9a/GLP in silencing of the two-cell-specific retrotransposon MERVL in mouse ES cells. *Epigenetics & Chromatin*, *6*(1), 15. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-6-15>
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., ... Church, G. M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science (New York, N.Y.)*, *339*(6121), 823–6. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>
- Mimura, T., Kaji, Y., Noma, H., Funatsu, H., & Okamoto, S. (2013). The role of SIRT1 in ocular aging. *Experimental Eye Research*, *116*, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.07.017>
- Nielsen, A. L., Ortiz, J. A., You, J., Oulad-Abdelghani, M., Khechumian, R., Gansmuller, A., ... Losson, R. (1999). Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family. *The EMBO Journal*, *18*(22), 6385–6395. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.22.6385>
- Pek, J. W., Anand, A., & Kai, T. (2012). Tudor domain proteins in development. *Development*, *139*(13), 2255–2266. <https://doi.org/10.1242/dev.073304>
- Peng, H., Feldman, I., & Rauscher, F. J. (2002). Hetero-oligomerization Among the TIF Family of RBCC/TRIM Domain-containing Nuclear Cofactors: A

BIBLIOGRAFIA

Potential Mechanism for Regulating the Switch Between Coactivation and Corepression. *Journal of Molecular Biology*, 320(3), 629–644.

[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00477-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00477-1)

Plasmid DNA purification. (n.d.). Retrieved from http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Plasmid DNA Purification/UM_pDNA_NuBoXtra.pdf

Ralser, M., Michel, S., & Breitenbach, M. (2012). Sirtuins as regulators of the yeast metabolic network. *Frontiers in Pharmacology*, 3, 32.

<https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00032>

Raurell Vila, H. (2014). *Regulació de l'heterocromatina constitutiva en condicions normals i d'estrés: papers de SirT1 i d'HP1*. Universitat de Barcelona.

Relton, C. L., & Davey Smith, G. (2010). Epigenetic epidemiology of common complex disease: prospects for prediction, prevention, and treatment. *PLoS Medicine*, 7(10), e1000356. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000356>

Rodriguez, A., & Bjerling, P. (2013). The links between chromatin spatial organization and biological function. *Biochemical Society Transactions*, 41(6), 1634–9. <https://doi.org/10.1042/BST20130213>

Schultz, D. C. (2002). SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes & Development*,

BIBLIOGRAFIA

16(8), 919–932. <https://doi.org/10.1101/gad.973302>

Schultz, D. C., Friedman, J. R., & Rauscher, F. J. (2001). Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2alpha subunit of NuRD. *Genes & Development*, 15(4), 428–443. <https://doi.org/10.1101/gad.869501>

Seto, E., & Yoshida, M. (2014). Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(4), a018713. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018713>

Shahbazian, M. D., & Grunstein, M. (2007). Functions of Site-Specific Histone Acetylation and Deacetylation. *Annual Review of Biochemistry*, 76(1), 75–100. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.052705.162114>

Shore, D., Squire, M., & Nasmyth, K. A. (1984). Characterization of two genes required for the position-effect control of yeast mating-type genes. *The EMBO Journal*, 3(12), 2817–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6098447>

Sripathy, S. P., Stevens, J., & Schultz, D. C. (2006). The KAP1 Corepressor Functions To Coordinate the Assembly of De Novo HP1-Demarcated Microenvironments of Heterochromatin Required for KRAB Zinc Finger Protein-Mediated Transcriptional Repression. *Molecular and Cellular Biology*, 26(22), 8623–8638. <https://doi.org/10.1128/MCB.00487-06>

BIBLIOGRAFIA

- Tachibana, K., Gotoh, E., Kawamata, N., Ishimoto, K., Uchihara, Y., Iwanari, H., ... Doi, T. (2015). Analysis of the subcellular localization of the human histone methyltransferase SETDB1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 465(4), 725–731.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.08.065>
- Trojer, P., & Reinberg, D. (2007). Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Molecular Cell*, 28(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.09.011>
- Vaquero, A. (2009). The conserved role of sirtuins in chromatin regulation. *The International Journal of Developmental Biology*, 53(2–3), 303–22.
<https://doi.org/10.1387/ijdb.082675av>
- Vaquero, A., Loyola, A., & Reinberg, D. (2003). The constantly changing face of chromatin. *Science of Aging Knowledge Environment : SAGE KE*, 2003(14), RE4. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12844523>
- Verdin, E., & Ott, M. (2015). 50 years of protein acetylation: from gene regulation to epigenetics, metabolism and beyond. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 16(4), 258–64. <https://doi.org/10.1038/nrm3931>
- Wang, H., An, W., Cao, R., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Chatton, B., ... Zhang, Y. (2003). mAM Facilitates Conversion by ESET of Dimethyl to Trimethyl Lysine 9 of Histone H3 to Cause Transcriptional Repression.

BIBLIOGRAFIA

Molecular Cell, 12(2), 475–487.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2003.08.007>

Wu, J., & Grunstein, M. (2000). 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(12), 619–23.

Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11116189>

Zhang, Q.-J., & Liu, Z.-P. (2015). Histone methylations in heart development, congenital and adult heart diseases. *Epigenomics*, 7(2), 321–30.

<https://doi.org/10.2217/epi.14.60>

Zhang, W., Wu, H., Yang, M., Ye, S., Li, L., Zhang, H., ... Liang, A. (2016).

SIRT1 inhibition impairs non-homologous end joining DNA damage repair by increasing Ku70 acetylation in chronic myeloid leukemia cells.

Oncotarget, 7(12), 13538–50. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6455>

MATERIALS I MÈTODES

Obtenció del plàsmid de les proteïnes clonades SirT1, KAP-1 i SETDB1

Transformació

La preparació de les cèl·lules competents és necessària per la posterior transformació. S'inoculen 6 ml LB amb una colònia de bacteris O/N a 37°C, o bé, es fan servir uns 10µl d'alguna alíquota restant. Inocular 200 ml d'LB amb el cultiu O/N. Incubar a 37°C en agitació fins que la D.O.₆₀₀ sigui al voltant de 0,3. Resuspendre les cèl·lules en 100ml de 50mM CaCl₂ fred, prèviament preparat. Resuspendre les cèl·lules en 16ml 50mM CaCl₂ / 15% de Glicerol estèril fred. Els volums varien segons el pellet obtingut. Alíquotes de 100 µl.

Realitzar un xoc tèrmic: 10 minuts mínim en gel, 45 segons a 42°C i 2 minuts en gel. Agitació durant 45 minuts a 37°C. Sembrar tot el volum de la transformació en placa d'LB amb l'antibiòtic Ampicil·lina.

Midi prep

La purificació de l'ADN del plàsmid es porta a terme gràcies a un Kid preparat. El Kid és de la casa MACHEREY-NAGEL (NucleoBond® Xtra Midi/Maxi) ("Plasmid DNA purification," n.d.)

Quantificació DNA

Utilitzem el nanodrop per calcular la concentració d'ADN present en 1µl. Ho fa mitjançant el càlcul de l'absorbància a ABS₂₆₀, ja que ens permet analitzar si l'ADN és pur o no, fent servir una ratio establerta entre $ABS_{260} / ABS_{280} = 1,8 - 2$. Càlcul a seguir per la quantificació: $ABS_{260} \cdot UDO \cdot Dilució$.

Línies cel·lulars

HeLa

És una línia cel·lular epitelial procedent d'un carcinoma cervical amb la qual es va establir el primer llinatge cel·lular permanent. Després de sumatòries divisions cel·lulars no moren, per aquest motiu es diu que són immortals. El seu creixement és molt estable i increïblement ràpid. Són adequades per fer-hi tractaments.

NIH3T3

ANNEX

Les cèl·lules 3T3 provenen d'una línia cel·lular estable de fibroblasts embrionaris de ratolí amb morfologia mesenquimal.

293F (HEK 293F)

Cèl·lules embrionàries de ronyó humà, les quals proliferen i es transfecten molt fàcilment.

Totes les línies cel·lulars són crescudes i mantingudes en DMEM (Gibco) suplementat amb el 10% de suero boví fetal a 37°C en 5% CO₁.

Expressió i obtenció de proteïnes

Transfecció cel·lular

Inserció de material genètic extern a les cèl·lules eucariotes (HeLa) mitjançant plasmidis clonats amb el DNA de les nostres proteïnes d'interès. Tots els plàsmids s'han transfectat utilitzant el polímer polietilenimina (PEI). Aquest s'incuba 5 minuts amb l'ADN específic a temperatura ambient i s'afageix a les cèl·lules les quals són lisades al cap de 48 hores.

Extracte proteïna

- Variant del mètode Dignam

Extracció de les proteïnes citoplasmàtiques mitjançant 500 µl d'un tampó hipotònic, Buffer A (10 mM Hepes pH 7.9; 1.5 mM MgCl₂; 10 mM KCl amb 25 µl de Cocktel inhibidor de proteïnes i 25 µl de DTT 0,5 mM). Incubació de 10 minuts en gel. Centrifugació d'1 minut a 13.000rpm. Obtenir sobrenedant (SN1).

Extracció de les proteïnes nuclears amb 500 µl d'un segon tampó hipertònic, Buffer C (10 mM Hepes pH 7.9; 1.5 mM MgCl₂; 0.42 M NaCl; 25% Glicerol; 0.2 mM EDTA amb 25 µl de Cocktel de proteïnes i 25 µl de DTT 0.5 mM). Incubació durant 20 minuts en gel. Centrifugació d'un minut a 13.000rpm. Obtenir sobrenedant (SN2).

Es barregen els dos extractes (SN1 + SN2) per obtenir l'extracte total. Centrifugació durant 2 minuts a 13.000rpm. Obtenció sobrenedant (Whole cell Extract).

- PLB

Extracció total de les proteïnes mitjançant 10X LAEMMLI. Per una preparació de 1000ml: 10.0 gr de SDS, 144.2 gr de Glicina, 30.0 gr Tris Base i H₂O (temperatura

ANNEX

ambient) i afegim β -mercaptoetanol. Agitació de les mostres amb sonicador fins aconseguir un bon pipeteig de les mateixes.

Detecció de proteïnes per Western Blot

SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

És una tècnica àmpliament utilitzada per separar proteïnes segons la seva longitud de cadena polipeptídica, massa molecular i modificacions postraduccionals, entre d'altres. Preparació per a 6 gels d'1,5 mm o per 8 gels d'1 mm de Separating gel (10%): 19,04 ml H₂O, 12,96 ml de 1,5 M Tris pH 8.7, 16 ml d'Acilamida (Bis acilamida 37,5:1 30%), 480 μ l de 10% SDS, 75 μ l de TEMED, 300 μ l de 10% APS. Preparació per a 12 gels d'1,5 mm o 16 gels d'1 mm de Stacking gel (4%): 28,2 ml H₂O, 5 ml de 1M Tris pH 6.8, 6,7 ml d'Acilamida (Bis acilamida 29:1 30%, 400 μ l de 10% SDS, 100 μ l de TEMED i 100 μ l de 10% APS. Electroforesis a 200V i 400mÀ, durant 1 hora aproximadament.

Western Blot (WB)

És una tècnica que ens permet fer una identificació de proteïnes dins d'un extracte cel·lular total de proteïnes, una mescla molt complexa, anomenada també electrotransferència. La tècnica utilitza tres etapes: separació per mida (SDS-PAGE), transferència en suport sòlid durant 1 hora a 300W, 100V i a 460 mÀ/cubeta mitjançant paper de filtre i una membrana de nitrocel·lulosa AmershamTM ProtranTM de 0.2 μ m NC de (GE Healthcare life science) i visualització mitjançant la marcació de les proteïnes amb anticossos. Bloqueig de les membranes amb 10 gr de llet en pols dissolts en 200 ml de PBS tritó (dilució 1/10 de PBS 10x amb H₂O mQ i 1 ml de tritó). Tres rentats amb PBS Tween (dilució 1/10 de PBS amb H₂O mQ i 1 ml Tween). Incubació de les membranes durant 1 hora amb l'anticòs primari: α -Flag (1:1000), α -HA (1:5000), α -Myc (1:5000) i α -Actina (1:1000). Tres rentats amb PBS Tween. Incubació durant 30 minuts amb l'anticòs secundari: per α -Flag i α -HA és α -Rabbit (1:10000) i per α -Myc és α -Mouse (1:10000).

Detecció de proteïnes per Immunofluorescència (IF)

Les cèl·lules van ser transfectades, i després de 24 hores es van replaquejar en cobreobjectes i seguidament es van incubar durant 24 hores més. Les cèl·lules van ser fixades amb paraformaldehid al 4% durant 10 minuts a temperatura ambient i es van permeabilitzar durant 10 minuts amb 0,1% d'azida sòdica PBS, 0,5% de Triton-X, 0,5-

ANNEX

1% BSA. Els anticossos primaris i secundaris es van diluir en 0,1% d'azida sòdica PBS, 0,2% de Triton-X, 0,5-1% BSA. Com anticossos secundaris anti-Rabbit Alexa Flour 555 (vermell) i anti-Mouse Alexa Four 488 (verd), de Molecular Probes, van ser utilitzats. Les cèl·lules es contrasten amb DAPI (Sigma) i els portaobjectes es van muntar en Mowiol. Es van obtenir imatges de les cèl·lules marcades utilitzant un làser de rastreig microscopi confocal Leica SP5.

Immunoprecipitació (IP)

És una tècnica basada en la precipitació de les proteïnes d'interès (antigen) de la solució mitjançant un anticòs que s'uneix específicament a la proteïna que estem estudiant. En aquest estudi les IPs van ser realitzades utilitzant Flag-agarosa (Sigma), HA-agarosa (Sigma). Les proteïnes van ser eluïdes amb 0,2 M de glicina amb pH 2,3. Els resultats obtinguts després de l'electroforesi, la transferència i el tractament amb anticossos van ser observats a través d'un western blot.

Els anticossos contra etiqueta utilitzats van ser, igual que la detecció de proteïnes per western blot, α -Flag (1:1000), α -HA (1:5000), α -Myc (1:5000) i com anticossos secundaris α -Rabbit (1:10000) i α -Mouse (1:10000).

Tractament amb H₂O₂

Incubar les cèl·lules 1 hora a 37°C amb 2 mM d' H₂O₂ just abans de recollir-les.

Detecció del complex SirT1/KAP-1/SETDB1

Per la detecció del complex s'utilitza una columna Superose 6, 10/300 GL d'exclusió nuclear instal·lada en un sistema de cromatografia FPLC (Fast protein liquid Chromatography).

CRISPR: Genome editing

Disseny ARNg

El disseny dels ARN guia es realitzen mitjançant un programa informàtic de nom CRISPOR.TFOR. Aquest programa ens permet seleccionar la seqüència més adequada

ANNEX

pel nostre estudi, mitjançant uns patrons de validesa i qualitat. Per tal d'assegurar-nos que el nostre ARN guia sigui adequat per l'experiment cal que, per una banda tingui un score superior a 70 i, per altra banda, es realitzi en exons, seleccionant sempre aquells que siguin majoritàriament comuns en totes les variants de seqüència.

Clonatge ARNg

- Lligació Oligos

Un cop obtinguts els ARN guia, fem la lligació dels oligonucleòtids de la seqüència Forward i la seqüència Reverse. La lligació es porta a terme mitjançant un tampó d'hibridació 10x. Tanamteix, es necessita portar la lligació a una temperatura de 96°C per tal d'evitar la formació de dímers i posteriorment el seu refredament per hibridar les cadenes de nou i lligar els dos primers.

- Digestió plàsmid

Digerim el plàsmid pSpCas9 (BB) – 2A – GFP (PX458) amb l'enzim de restricció BbsI, per aquest motiu cal que els ARNg continguin uns extrems de seqüència determinats: 5' – CACCGNNN... – 3' i 3' - ...NNNCAAA – 5'. Purificació del plàsmid.

- Lligació vector i ARNg

Incubar entre 2 hores i O/N el plàsmid digerit i purificat amb els oligonucleòtids diluïts, un tampó de lligació T4 i la lligasa T4.

Sorter

Servei extern.

Comprovació de clons positius

Observació per microscòpia del creixement dels clons. Comprovació mitjançant SDS-PAGE i Western Blot. Anticossos primaris per endogen: α - SirT1 2G1 (1:10000) i α - Actina (1:10000) Anticossos secundaris: α -Mouse (1:10000).

ANNEX

Seqüències dels ARNg per SirT1 humà i ratolí.

A

5'...**INTRON4**...GAAATATATCCTGGACAATTCCAGCCATCTCTGTGCACAAATTCATAGCCTTGTGAGAT
AAGGAAGGAAAACACTTTCGCAACTATACCCAGAACATAGACACGCTGGAACAGGTTGCGGGAATCCA
AAGGATAATTCAGTGTGATG...**INTRON5**...GTTCTTTGCAACAGCATCTTGCTGATTTGTAAATACAAA
GTTGACTGTGAAGCTGTACGAGGAGATATTTTAAATCAG...**INTRON6**...GTAGTTCCTCGATGTCCTAGG
TGCCCAGCTGATGAACCGCTTGCTATCATGAAACCAGAGATTGTGTTTTTGGTGGAAAATTTACCAGAAC
AGTTTCATAGAGCCATGAAGTATGACAAAGATGAAGTTGACCTCCTCATTGTTATTGGGTCTTCCCTCAA
AGTAAGACCAGTAGCACTAATTCAA...**INTRON7**...3'

B

5'...GCCAGTGCCGCGCTCGAGCGGAGCAGAGGAGGCGAGGGCGGAGGGCCAGAGAGGCAGTTGGA
AGATGGCGGACGAGGTGGCGCTCGCCCTCAGGCGCCGGCTCCCTTCCGCGGCGGCCCATGGAGG
CCGCGTCGCAGCCGGCGGACGAGCCGCTCCGCAAGAGGCCCGCCGAGACGGGCCTGGCCTCGGGCG
CAGCCCGGGCGAGCCGAGCGCAGCAGTGGCGCCGGCGGCCGCGGGGTGTGAGGCGGCGAGCGCCGC
GGCCCGGGCGCTGTGGCGGGAGGCGGCAGGGGCGGCGGCGAGCGCGGAGCGGGAGGCCCGGGC
GACGGCCGTGGCCGGGACGGAGACAATGGTCCGGCCTGCGGCGGGAGCCGAGGGCGGCTGACGAC
TTCGACGACGACGAGGGCGAGGAGGAGGACGAGGCGGCGGCGGCGAGCGGCGGCGGCGAGCGATCGGC
TACCGAG...**INTRON1**...ACAACCTCCTGTTGACCGATGGACTCCTCACTAATGGCTTTCATTCTGTGAAA
GTGATGACGATGACAGAACGTACACGCCAGCTCTAGTACTGGACTCCGCGGCCGCGGATAG...**INTRO**
N2...GTCCATATACTTTTGTTCAGCAACATCTCATGATTGGCACCAGTCTCGAACAATTCTTAAAGATTTA
TTACCAGAAACAATTCCTCCACCTGAGCTGGATGATATGACGCTGTGGCAGATTGTTATTAATATCCTTTC
AGAACCACCAAAGCGGAAAAAAGAAAAGATATCAATACAATTGAAGATGCTGTGAAGTTACTGCAGG
AGTGTA AAAAGATAATAGTTTCTGACTGGAGCTGGG...**INTRON3**...GTTTCTGTCTCTGTGGGATTCCTGA
CTTCAGATCAAGAGACGGTATCTATGCTCGCCTTGCGGTGGACTCCAGACCTCCAGACCCTCAAGCC
ATGTTTGATATTGAGTATTTAGAAAAGACCCAAGACCATTCTCAAGTTTGCAAAG...**INTRON4**...3'

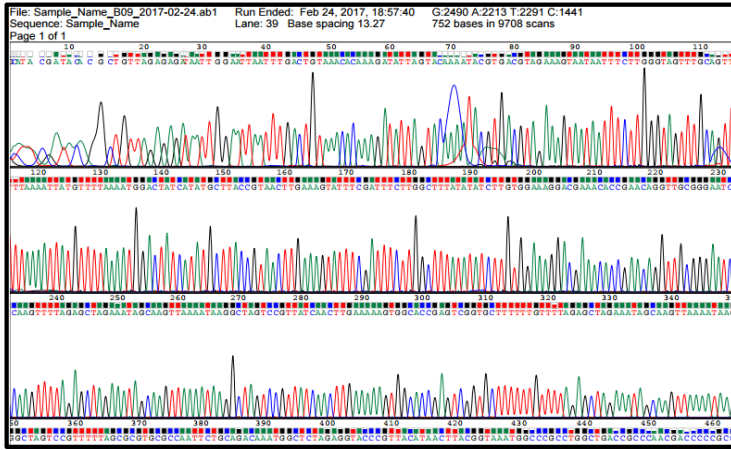
Figura 1. Seqüència genòmica de SirT1 humà i ratolí. A Tall de la seqüència genòmica de SirT1 humà de 5' a 3'. Introns (vermell) suprimits, seqüència de l'exó 5 (blau), seqüència de l'exó 6 (negre). **B** Tall de la seqüència genòmica de SirT1 de ratolí de 5' a 3'. Introns (vermell) suprimits, seqüència de l'exó 1 (blau), seqüència de l'exó 3 (negre). En gris es troben marcats els primers utilitzats per la posterior seqüenciació.

Clonatges els ARNg en el vector de Cas9.

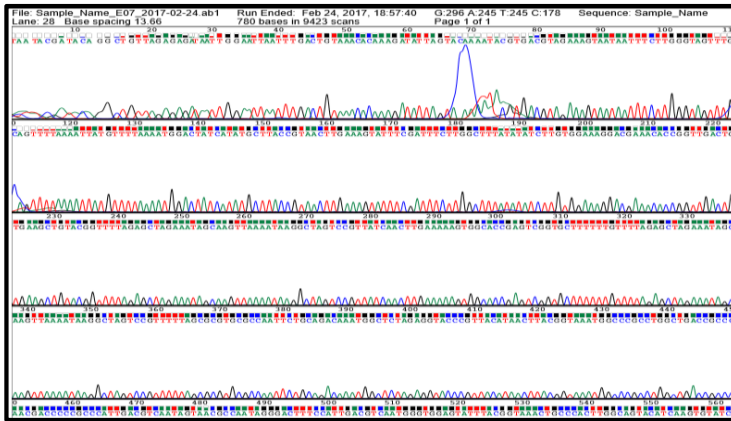
SirT1 humà

- ARNg 1: Exó 5

ANNEX

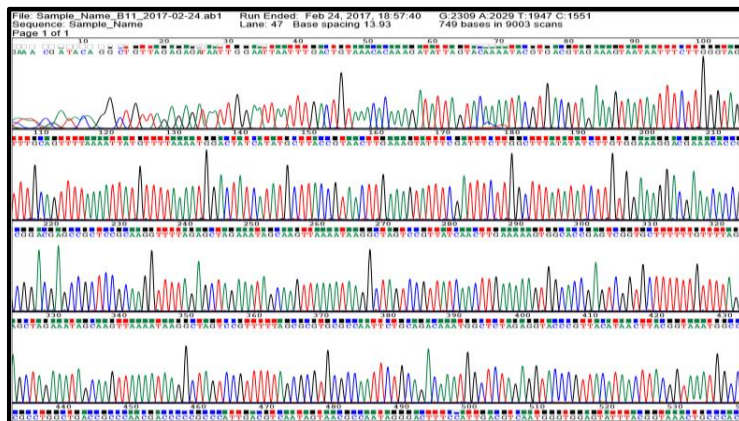


- ARNg: Exó 6



SirT1 ratolí

- ARNg 1: Exó 1



- ARNg 2: Exó 3

ANNEX

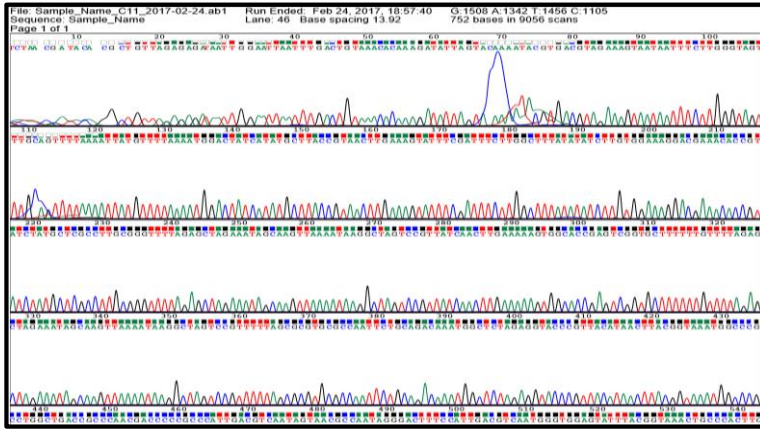
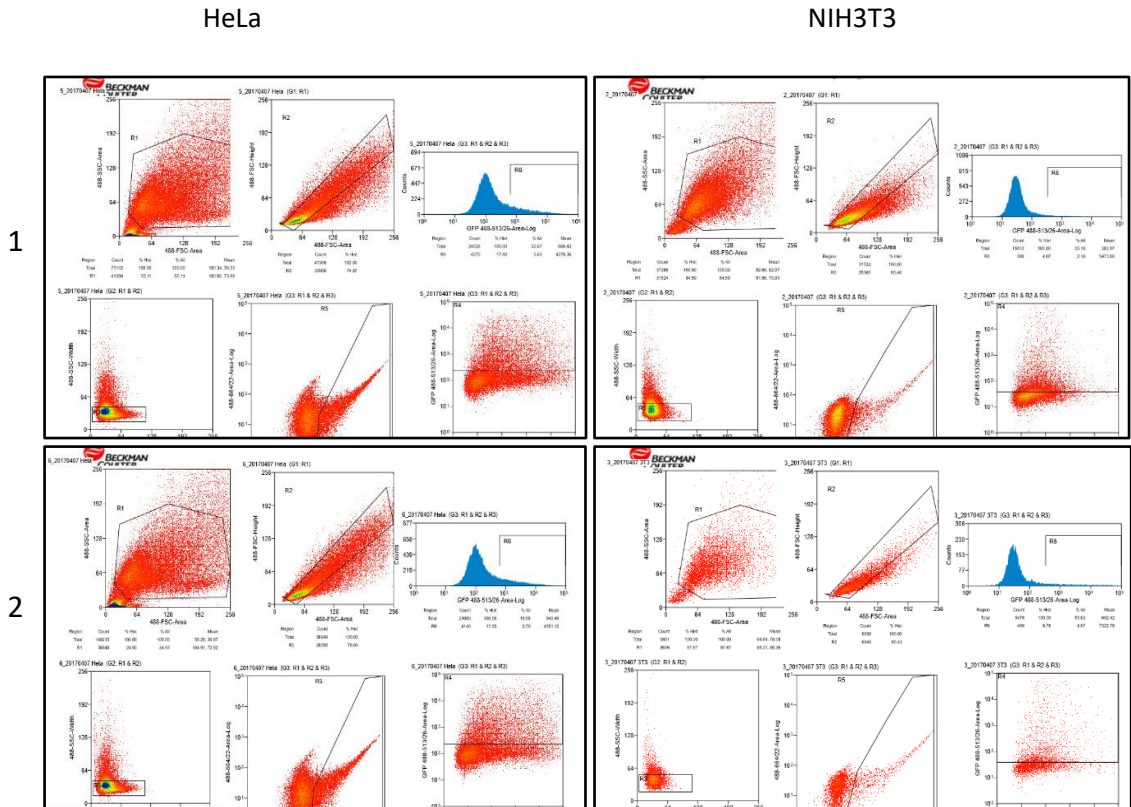


Figura 2. Seqüenciació dels clonats dels ARN guia. Les diferents seqüències del clonatge dels ARNg humans i de ratolí al vector de la Cas9 (PX458). ARNg 1 representa l'exó 5 per SirT1 humà, i l'exó 1 per SirT1 ratolí, ARNg 2 defineix l'exó 6 per SirT1 humà i l'exó 3 per SirT1 de ratolí.

Determinació i separació de les cèl·lules per Sorter.



ANNEX

1 + 2

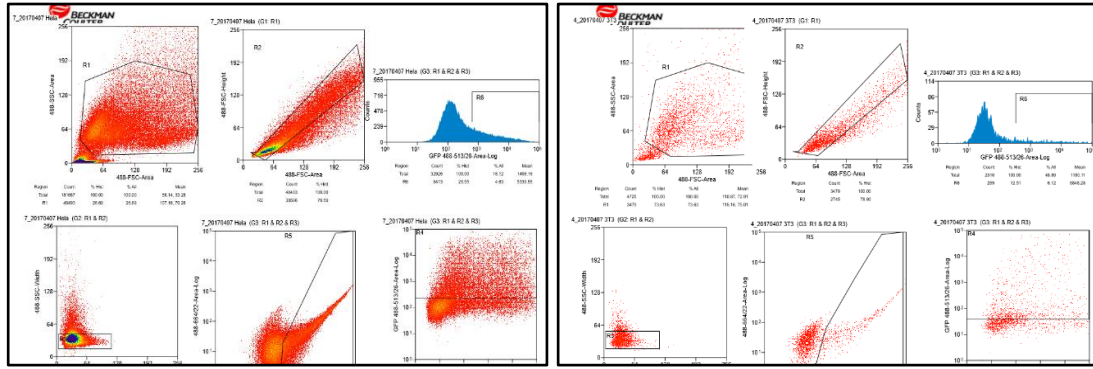


Figura 3. Identificació i selecció de les cèl·lules positives. Imatges del Sorter on es seleccionen les cèl·lules més adequades pel desenvolupament els clons. En el primer requadre de cada casella es menyspreen les cèl·lules mortes, en el segon requadre els doblatges, i en el tercer i el cinquè es fa la selecció de les cèl·lules més positives per GFP. Els números de la dreta, determinen quin ARNg s'utilitza a cada experiment, d'acord amb la correlació descrita anteriorment.