

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas.

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas,
PEDECIBA.

Rol de la proteína DBC1 en la regulación del metabolismo y ciclo celular



Mag. Leonardo Santos

Orientadores: Dr. Carlos Escande y Dr. José Badano

Imagen de portada: Estructuras de la Dbc1 murina (rojo) y DBC1 humana (azul)
generadas con Apha Fold

Lista de abreviaturas	3
Agradecimientos	6
Resumen	7
1. Introducción	9
1.1 Estructura y regulación	10
1.2 Funciones de DBC1 a nivel metabólico	13
1.3 DBC1 en el tejido adiposo blanco	16
1.4 DBC1 en el hígado	19
1.6 DBC1 y ciclo celular	24
1.7 DBC1 y cáncer	26
Hipótesis de trabajo	29
2. Objetivos	30
3. Materiales y métodos	31
3.1 Modelos animales	31
3.1.2 Modelo de regeneración hepática	32
3.2 Modelos celulares	33
3.3 Técnicas de biología molecular y bioquímica	35
3.3.1 Western Blot	35
3.3.1.1 Procesamiento de muestras	35
3.3.1.2 Preparación de las muestras para electroforesis	36
3.3.1.3 SDS-PAGE y Western Blot	37
3.4 Análisis estadístico	42

4. Corte proteolítico de la proteína DBC1 como mecanismo de regulación de su actividad biológica	43
4.1 Resultados	44
4.2 Discusión	69
5. Búsqueda de nuevos factores secretados regulados por DBC1	75
Perfil secretómico de células MEF WT y Dbc1 KO	85
4.2 Discusión	91
6. Generación de un ratón knockout condicional para Dbc1	96
6.1 Resultados	98
6.2 Discusión	120
7. Conclusiones generales	123
8. Perspectivas	126
9. Bibliografía	129

Lista de abreviaturas

ADNg ADN genómico

ARNg ARN guía de CRISPR/Cas9

ARNm ARN mensajero

BRCA Breast Cancer proteína

Cdks Cyclin-dependent kinases

CEUA Comisión de ética en el uso animal

CHX cicloheximida

CRE Recombinasa del sistema CRE/LoxP

CRISPR Clustered regularly interspaced short palindromic repeats

Dbc1 Mouse Deleted in Breast Cancer protein

DBC1 Human Deleted in Breast Cancer protein

DMEM Dulbecco modified eagle medium

DOC Sodium Deoxycholate

ER Estrogen Receptor

FEV Fracción estromal vascular

FSTL1 Follistatin-related protein 1

HDAC3 Histona deacetilasa 3

HepG2 Células inmortalizadas de hepatocarcinoma

IFNs Interferones

IMR90 Fibroblastos humanos inmortalizados

IPMon Instituto Pasteur de monteideo

IR Insulin resistance

KO Knock -out

loxP Secuencia de recombinación del sistema CRE/Loxp

MALAT1 Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1

MCC Mutated in colon cancer protein

MEF Mouse embryonic fibroblasts

MG132 Compuesto inhibidor del proteosoma

NAD+ Nicotinamide adenine dinucleotide

NAFLD Nonalcoholic fatty liver disease

PARP1 Poly [ADP-ribose] polymerase 1

PEPCK Phosphoenolpyruvate carboxykinase

SDS-PAGE Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida

SFB Suero fetal bovino

SIRT1 NAD-dependent deacetylase sirtuin-1

TA Tejido adiposo

TCA Trichloroacetic acid

TRIC Isotiocianato de tetrametil rodamina

UATE Unidad de animales transgénicos y de experimentación

WB Western Blot

WT Wild Type

Agradecimientos

A Carlos Escande y José Badano por darme la oportunidad de realizar el doctorado y abrirme la puerta de sus laboratorios.

A Martina Crispo y todo el personal de la UATE, del Instituto Pasteur de Montevideo.

A Rosario Durán y su equipo de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica del IPMon.

A la ANII y a PEDECIBA por el apoyo brindado.

Resumen

La proteína DBC1 interacciona y modula la actividad de factores de transcripción, modificadores epigenéticos, receptores nucleares, y ácidos nucleicos. De esta forma, DBC1 regula procesos celulares vinculados al metabolismo energético y al ciclo celular. Gran parte de la información sobre las funciones de la proteína fue obtenida estudiando ratones knockout para DBC1 (*Dbc1* KO). Sin embargo, este modelo cuenta con sus limitaciones. En especial cuando se quiere estudiar el rol de una proteína en distintos tejidos, y como sus funciones en un tejido específico afecta la función de otros tejidos u órganos.

En el presente trabajo estudiamos la regulación de la proteína mediante estudios *in-vitro* e *in-vivo* en el contexto del ciclo celular. Encontramos que DBC1 es procesada proteolíticamente durante el arresto en el ciclo celular, tanto en células como en tejidos, dando una nueva forma estable de la proteína que dimos en llamar DN-DBC1, debido a que pierde su dominio N-terminal. También observamos que la expresión de ambas formas de DBC1 es regulada dinámicamente en función del estado proliferativo celular. Caracterizamos estructuralmente a DN-DBC1 determinando que no cuenta con los sitios de unión reportados para varios de sus interactores. Hallamos que funcionalmente DN-DBC1 pierde la capacidad de interactuar con SIRT1 e inhibir su actividad. Finalmente, determinamos que la presencia de DBC1 es necesaria para que la progresión del ciclo ocurra con normalidad.

Por otra parte, en este trabajo de tesis también nos enfocamos en buscar nuevas proteínas reguladas por DBC1. En particular nos centramos en entender el posible rol de la proteína en la regulación de factores secretados que actúen de forma paracrina y endocrina mediando los efectos que observamos en nuestro modelo KO para DBC1. Fue así que hallamos que DBC1 regula la secreción de

la proteína Follistatin-like 1 (FSTL1), una proteína que entre otras cosas participa en el proceso de diferenciación de los adipocitos. Observamos que *Fstl1* está aumentada en el tejido adiposo de los animales *Dbc1* KO. También utilizando proteómica comparativa encontramos varias proteínas que son secretadas diferencialmente en células de WT y *Dbc1* KO y que pueden jugar un rol en procesos fisiológicos regulados por DBC1.

Finalmente, en este trabajo de tesis logramos desarrollar una nueva herramienta para ahondar en el estudio de las funciones de DBC1 en los distintos tejidos: un modelo murino donde el gen *Dbc1* puede ser silenciado en forma condicional mediante el sistema Cre-LoxP. Describimos el diseño experimental donde utilizamos CRISPR/Cas9 para editar el gen de *Dbc1*, así como la evaluación del noqueo de la expresión de la proteína tanto en células en cultivo como en adipocitos maduros *in-vivo*.

1. Introducción

La proteína DBC1 (*Deleted in breast cancer 1*) fue identificada por primera vez en un estudio genético donde se buscaban supresores tumorales en una región del cromosoma 8 que con frecuencia está eliminada en pacientes con cáncer de mama¹. De los seis genes que se encuentran en dicho locus, dos de ellos no habían sido caracterizados hasta entonces y fueron denominados DBC1 y DBC2¹. A pesar del nombre con que fue bautizada la proteína, cuál es su rol en la etiología del cáncer es un asunto que aún hoy no está saldado. Se ha examinado la expresión de la proteína en distintos tipos de cáncer y se ha reportado a DBC1 con un rol de supresor de tumores en algunos contextos y tumorigénico en otros².

DBC1 es una proteína paróloga de CCAR1 (cell division cycle and apoptosis regulator protein 1)³. DBC1 y CCAR1 comparten un ancestro en común, manteniendo la configuración de sus principales dominios estructurales. Esta característica sumada al hecho de que DBC1 y CCAR1 cumplen funciones similares, como son la regulación del ciclo celular así como también apoptosis, han hecho que DBC1 también sea denominada CCAR2. Durante este trabajo de tesis nos referiremos a la proteína como DBC1.

La proteína DBC1 es de localización nuclear y se expresa de manera ubicua en vertebrados. Hoy en día sabemos que la proteína ejerce sus funciones biológicas mediante la interacción proteína-proteína y proteína-ARN, estabilizando, activando o inhibiendo la actividad de sus blancos moleculares. De esta forma DBC1 participa en diversos procesos como la reparación del daño al ADN^{4,5}, la senescencia⁶, la apoptosis^{7,8}, en la maduración de ARN mensajeros⁹ y en la regulación del ciclo circadiano¹⁰. A su vez es un modulador de la expresión génica interaccionando con varios factores de transcripción, receptores

nucleares y modificadores epigenéticos¹¹⁻¹⁸. En suma DBC1 es una proteína multifuncional que participa en diversos procesos celulares. Entender como la proteína es regulada en estos procesos fue uno de los objetivos de esta tesis.

A continuación describiremos lo que hasta hoy en día se conoce sobre la estructura y las modificaciones postraduccionales que presenta la proteína DBC1.

1.1 Estructura y regulación

El conocimiento que se tiene sobre la estructura de DBC1 es en base a comparaciones estructurales en base a secuencias. No contamos con modelos realizados por técnicas de biología estructural clásicas. Probablemente esto se deba a que es una proteína difícil de purificar y cristalizar.

La proteína humana y la murina comparten similitud de secuencia del 91% y una idéntica distribución de dominios conformacionales. Tienen una masa molecular de 100 kDa, y son principalmente proteínas desestructuradas^{3,19}. Se ha postulado que los dominios desestructurados en este tipo de proteínas le confieren flexibilidad en la interacción con sus blancos moleculares y estabilizan la unión entre sus interactores²⁰. DBC1 Además cuenta con seis dominios estructurados que enumeramos a continuación. La localización de estos dominios, así como su rol en la interacción con los diferentes blancos de DBC1 se describen en la figura 1.1

En su extremo amino terminal, DBC1 cuenta con un dominio de unión a ARN de tipo S1³. DBC1 en conjunto con la proteína ZNF326 forma el complejo DBIRD que interacciona con la ARN polimerasa II y el ARNm. Probablemente DBC1 interaccione con el ARNm mediante su dominio S1, en la formación de este complejo. Este complejo ribonucleoproteico regula la transcripción y el corte y empalme de algunos ARNm⁹. También mediante su dominio S1, DBC1

interacciona con MALAT1, un ARN largo no codificante (lncRNA) que entre otras cosas regula la proliferación celular durante la regeneración hepática^{21,22}. La unión de MALAT1 a DBC1 desplaza su unión a SIRT1 lo que reprime la apoptosis mediada por p53²². Por tanto el efecto de DBC1 sobre MALAT1 podría estar contribuyendo en la regulación del ciclo celular.

Continuando hacia el extremo carboxilo, el siguiente dominio con que cuenta DBC1 es un cierre de leucinas (LZ) característico en las interfaces proteína proteína de factores de transcripción. Este dominio participa en la interacción entre DBC1 y HDAC3¹¹. Además fue originalmente el dominio propuesto en mediar la interacción entre DBC1 y SIRT1¹².

DBC1 posee también un dominio globular Nudix, que conserva homología con la hidrolasa de nucleósidos difosfato del mismo nombre, pero catalíticamente inactivo¹⁹. Este dominio mantiene su capacidad de unirse al NAD⁺ y a la ADP-ribosa¹⁹. La unión de NAD⁺ al dominio Nudix evita que DBC1 interaccione y reprima la actividad de PARP1, una enzima que participa de la reparación del daño al ADN⁵. De esta forma el NAD⁺, un metabolito central en el metabolismo celular, es un regulador de la unión entre PARP1 y DBC1.

Próximo a su extremo carboxilo, DBC1 cuenta también con un dominio EF-Hand de unión a Ca²⁺ y un dominio *coiled coil* (CC). No hay reportes de que el dominio unión al calcio sea activo pero se plantea que el EF-Hand puede participar en la formación de heterodímeros de proteínas¹⁹. Se ha mapeado el sitio de unión del receptor nuclear Reb-erv α sobre la región de DBC1 que comprende los dominios EF-Hand y CC¹⁰. Mediante esta interacción, DBC1 estabiliza a Reb-erv α , regulando su actividad transcripcional, lo que tiene efectos a nivel metabolismo y el ciclo circadiano^{10,23}.

Por otro lado, se han encontrado varias modificaciones postraduccionales que regulan la capacidad de unión de DBC1 a sus blancos. La acetilación de las lisinas K112 y K215 de la DBC1 humana por la acetilasa hMOF, interfiere en la interacción DBC1/SIRT1²⁴. La acetilación de DBC1 es inducida en mecanismos de respuesta al daño al ADN mediados por p53²⁴. A su vez, en respuesta al estrés genotóxico la DBC1 humana es fosforilada en su treonina Thr 454 por la enzima ATM (ataxia telangiectasia-mutated). La fosforilación promueve la unión e inhibición de la actividad SIRT1 y esto reprime a la apoptosis²⁵. En la dirección opuesta, la desfosforilación de Thr454 induce la activación apoptosis dependiente de p53²⁶. Además de ATM, la fosforilación de la Thr454 puede ser catalizada por la enzima CK2 α ²⁷. Por otra parte, la inducción de la acetilación de DBC1 en sus lisinas K54 Y K97 interfiere en la activación de la vía Wnt, debido a una disminución en la unión de DBC1 a β -catenina²⁸. Por último, otra forma de regulación postraducciona reportada es inducida por TNF- α y mediada por caspasas. El corte de DBC1 en dos fragmentos, p120 y p66 inducen la activación de la apoptosis²⁹. En suma, se conocen varias modificaciones postraduccionales que regulan la función de DBC1 en respuesta al estrés genotóxico y que modulan mecanismos apoptóticos.

Varios de los interactores de DBC1 compiten en la unión a la proteína, desplazándose mutuamente^{16,18,22,30}. Esto de alguna manera significa otra dimensión en la regulación de la actividad DBC1, que parece depender de las relaciones de concentración relativas de DBC1 y sus interactores. Además, se ha observado que DBC1 interacciona consigo misma³¹. Esto podría ser clave en la forma en que DBC1 interactúa con sus blancos molecular. En relación a esto en el presente trabajo exploramos la capacidad que tiene la proteína de formar multímeros.

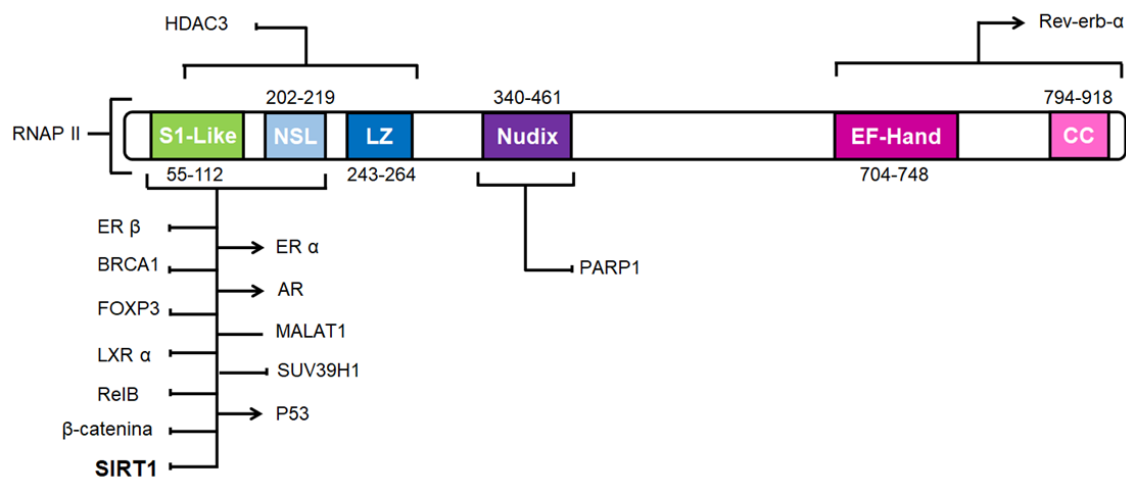


Figura 1.1 Visión esquemática de la proteína DBC1 Están indicados en colores los dominios estructurales identificados en DBC1 y los sitios aproximados de unión de la mayoría de los interactores de DBC1 reportados

En definitiva, la regulación que DBC1 ejerce sobre varios de sus blancos moleculares, afecta distintas vías implicadas en procesos metabólicos. Esto posiciona a DBC1 en un lugar de relevancia en la modulación de la homeostasis metabólica a nivel celular y sistémico.

1.2 Funciones de DBC1 a nivel metabólico

Los estudios en animales *Dbc1* KO evidencian la importancia de DBC1 en la regulación metabólica y su impacto a nivel sistémico. Los ratones *Dbc1* KO, especialmente las hembras, no desarrollan intolerancia a la insulina, esteatosis hepática^{23,32,33} ni aterosclerosis cuando son alimentados con dietas ricas en grasas. Además mantienen los niveles en sangre de ácidos grasos libres a la par que los alimentados con dieta balanceada^{32,34}. Sin embargo, estos ratones desarrollan obesidad mórbida en mayor nivel que los ratones WT. Este fenómeno, conocido como obesidad paradójica u obesidad saludable³⁵, donde la obesidad se disocia de sus consecuencias metabólicas deletéreas, llama particularmente la atención, máxime cuando ha comenzado a ser detectado en la práctica clínica³⁶. El fenotipo de obesidad saludable que desarrollan los

ratones *Dbc1* KO pone en evidencia que DBC1 puede ser un regulador clave de los mecanismos que mantienen la homeostasis energética y que llevan al desarrollo de patologías metabólicas como la diabetes, resistencia a la insulina e inflamación durante la obesidad.

Está claramente establecido que el socio fundamental de DBC1 en la regulación del metabolismo energético es la desacetilasa SIRT1. Esta enzima pertenece a una familia de enzimas que desacetila factores de transcripción, histonas, y enzimas de vías metabólicas, a expensas de la hidrólisis de NAD⁺³⁷. SIRT1 sensa el estatus energético celular en distintos tejidos de importancia metabólica³⁷. Es entonces una proteína central en distintos aspectos de la regulación metabólica como la gluconeogénesis hepática³⁸, la secreción de insulina^{39,40}, la sensibilidad a la insulina^{41,42}, y el metabolismo lipídico^{43,44}. Se ha demostrado que la actividad de SIRT1 es modulada por DBC1 según la carga metabólica de la célula. La interacción entre las dos proteínas se hace más fuerte en presencia de exceso de energía y se debilita en condiciones de privación energética^{32,34}. Estos cambios en la dinámica de unión regulan la actividad de SIRT1 y en consecuencia la administración metabólica de la glucosa y de los lípidos a nivel sistémico⁴⁴⁻⁴⁶.

La modulación de la unión SIRT1/DBC1 y consecuente actividad de SIRT1 es mediada en parte por la vía AMPc/PKA/AMPK⁴⁷. La activación de esta vía, que es regulada al alza durante la deprivación energética⁴⁸ induce la separación del complejo DBC1-SIRT1. No está claro si la kinasa AMPK fosforila directamente SIRT1 y/o DBC1⁴⁷ liberando la unión entre ambas proteínas, o si lo hace mediante alguna proteína intermediaria. Existen reportes que GAPDH podría intermediar entre AMPK y el complejo SIRT1/DBC1⁴⁹, aunque no es claro si este es el único mecanismo de regulación del complejo. En línea con el concepto que el complejo SIRT1/DBC1 se disocia durante la deprivación energética a través

de la activación de cAMP/PKA/AMPK, el incremento en la actividad de PKA limita la aparición de esteatosis hepática en la obesidad, al igual que sucede cuando se suprime la expresión de DBC1^{34,50} (situación comparable a una disociación completa del complejo SIRT1/DBC1, con máxima actividad SIRT1). Lo mismo ocurre cuando AMPK es activada⁵¹. En suma, la interacción entre DBC1 y SIRT1 es sensible a la carga metabólica y a la activación de vías conservadas que se encargan de mantener el balance energético. Esto significa que la regulación que DBC1 ejerce sobre SIRT1 tiene impacto en la administración de los recursos energéticos en la célula y el organismo entero.

Si bien la interacción DBC1/SIRT1 es importante en la regulación de distintas vías y procesos metabólicos controlados por DBC1, es posible que las acciones de esta proteína sobre el metabolismo trascienden su efecto sobre SIRT1. Modelos animales donde se sobreexpresa a SIRT1⁵² o se incrementa su actividad farmacológicamente⁴⁵ presentan fenotipos metabólicos que no se corresponde con el observado para los ratones *Dbc1* KO. Un aspecto fundamental que los diferencia, es que los animales con actividad Sirt1 aumentada presentan una menor ganancia de peso que los WT al ser alimentados con dietas obesogénicas^{32,34,45,52}. En concreto, estos datos sugieren que el accionar de DBC1 en aspectos vinculados al metabolismo no se restringe a la regulación de la actividad de SIRT1, y que el fenotipo observado en los ratones *Dbc1* KO es el resultado de la interacción de DBC1 con más de uno de sus blancos .

Como mencionamos más arriba, los ratones *Dbc1* KO alimentados con dietas obesogénicas presentan una mayor sensibilidad a la insulina respecto a sus controles³⁴. Simultáneamente el tejido adiposo de estos animales también muestra una mayor sensibilidad a la insulina^{32,44}. Es así que el fenotipo metabólico que presentan los KO y el papel preponderante que tiene el tejido

adiposo en mantener la homeostasis metabólica, han motivado a indagar a fondo sobre la función que DBC1 cumple a nivel del tejido adiposo blanco.

1.3 DBC1 en el tejido adiposo blanco

El tejido adiposo blanco es un órgano dinámico y complejo, con una gran capacidad de expandirse y contraerse según la carga metabólica del individuo. Está compuesto principalmente por adipocitos, acompañados de una fracción estromal vascular conformada por, fibroblastos, células endoteliales, células del sistema inmune (principalmente macrófagos), células estromales y pre-adipocitos. Los depósitos subcutáneos, perigonadal y visceral son los más abundantes y estudiados. Ante un balance calórico positivo, el tejido adiposo blanco almacena el excedente de energía en forma de triglicéridos dentro de los adipocitos, las células especializadas en esta función. En la dirección opuesta durante la privación calórica o ante una alta demanda energética los adipocitos se encargan de administrar ácidos grasos y glicerol al torrente sanguíneo para que los tejidos periféricos cuenten con la energía suficiente para satisfacer sus necesidades metabólicas. Igualmente esto es solo una parte de las funciones que cumple este tejido, que en conjunto con el hígado, músculo, páncreas, y cerebro, es responsable de mantener la homeostasis energética de todo el organismo.

Cuando el tejido adiposo blanco se encuentra saludable y mantiene su capacidad de expandirse para acopiar energía, colabora en mantener estables los niveles de glucosa y lípidos en sangre en respuesta a la insulina^{32,53,54} al glucagón y a las catecolaminas⁵⁵. A su vez actúa a nivel parácrino y endócrino, secretando péptidos y moléculas de bajo peso molecular que regulan la dinámica del mismo tejido adiposo y de otros órganos periféricos encargados de mantener la glucosa estable, así como la ingesta. Hoy se conocen múltiples

factores solubles, algunas que son secretadas exclusivamente por el tejido adiposo, las denominadas adipoquinas y lipoquinas. Hay otros factores que no son secretados exclusivamente por el tejido adiposo, como por ejemplo las citoquinas proinflamatorias. Se han identificado más de 600 proteínas secretadas por el tejido adiposo humano⁵⁶. Los efectos de algunas de estas proteínas han sido muy bien caracterizados; la adiponectina, la leptina, TNF- α y IL-6, son algunos ejemplos. Pero sobre la gran mayoría de las moléculas identificadas todavía se desconoce su actividad biológica. A fin de cuentas el tejido adiposo es emisor y receptor de este tipo de moléculas participando activamente en la regulación metabólica y en el desarrollo de los trastornos del metabolismo comúnmente caracterizados por la insulinoresistencia⁵⁷.

En el contexto del tejido adiposo y los adipocitos DBC1 también juega un papel importante. En modelos animales se observa un aumento en la interacción DBC1/SIRT1 en tejido adiposo de animales obesos. Este aumento de la interacción se ve acompañado de una disminución de la actividad de SIRT1³².

DBC1 inhibe la adipogénesis y limita la diferenciación de los adipocitos. Ante la ausencia o disminución de la expresión de DBC1, tanto en tejido adiposo como en adipocitos en cultivo, se observa incrementada la expresión de genes que participan en vías adipogénicas y lipogénicas. Factores como Lipina 1 y GLUT4 se ven aumentados en el tejido adiposo de animales KO^{32,58}. Mientras tanto *in-vitro*, ante la disminución en la expresión de DBC1 aumenta la expresión de diferentes marcadores de diferenciación como Ppar- γ , Perilipina 1, Gut4, Fasn y Scd1, entre otros^{32,59}. A su vez se observa aumentada al igual sucede en el hígado, la expresión de PEPCK. En tejido adiposo esta enzima participa en la síntesis *de novo* del glicerol necesario para la esterificación de los ácidos grasos en la síntesis de triglicéridos⁶⁰. De hecho los niveles de glicerol se observan aumentados en tejido adiposo *Dbc1* KO³². El tejido adiposo de los ratones KO

presenta una mayor capacidad de captación de lípidos, lo que seguramente contribuye a mantener bajos los lípidos en sangre³². Toda esta evidencia acumulada nos hace suponer que DBC1 interviene en la capacidad expansiva del tejido adiposo desempeñando un rol crucial en su fisiología.

En el contexto de obesidad inducida por dieta rica en grasas, la ausencia de DBC1 en el tejido adiposo y adipocitos en cultivo disminuye la expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 y PAI-1 entre otros, y aumentan la expresión de Adiponectina, un factor con actividad antiinflamatoria y sensibilizante de la insulina^{6,32,61}. Sumado a este decremento en la expresión de citoquinas, la ausencia de DBC1 disminuye la lipólisis inducida por TNF- α ⁵⁸. Hay indicios de que esta disminución en la inflamación crónica es debida a una menor activación de NF κ B.⁶¹ Al envejecer las hembras *Dbc1* KO ganan más peso con respecto a sus controles pero mantiene bajos los niveles de glucosa y ácidos grasos en plasma³². Los ratones machos no aumentan de peso al envejecer y desarrollan intolerancia a la glucosa. Esta última es revertida al activarse vías termogénicas en tejido adiposo, dependientes de PPAR- γ , un receptor nuclear maestro en la activación de la adipogénesis⁶².

Otro aspecto regulado por DBC1 en el tejido adiposo y los adipocitos es la senescencia celular. El tejido adiposo de los animales *Dbc1* KO obesos presentan niveles más bajos de marcadores de senescencia⁶. La evidencia experimental indica que DBC1 actuando sobre la desacetilasa de histonas HDAC3 modula el inicio de la senescencia⁶. Las células senescentes desarrollan un fenotipo altamente secretor y proinflamatorio, por lo que es posible que la disminución en la senescencia en el tejido adiposo de los KO sea uno de los factores que mantienen baja la inflamación en el tejido.

Las funciones descritas para DBC1 en procesos vinculados al metabolismo no sólo se restringen a procesos que ocurren dentro del tejido adiposo. Funciones

en otros tejidos relevantes en la mantención de la homeostasis metabólica han sido también identificadas.

1.4 DBC1 en el hígado

El hígado ocupa una posición predominante en el control del metabolismo sistémico. Entre otras cosas, se encarga de suministrar glucosa y lípidos al torrente sanguíneo. Fallas en el funcionamiento hepático como; la resistencia a la insulina y la esteatosis o NAFLD (por su sigla en inglés “Non-alcoholic fatty liver disease”), son frecuentes en las patologías metabólicas directamente vinculadas a la obesidad. Hay varios trabajos que demuestran cómo DBC1 está involucrada en la regulación del metabolismo hepático. En los animales *Dbc1* KO a los que se les induce esteatosis hepática al alimentarlos con dietas ricas en grasa, se observó protección contra la NAFLD³⁴. A su vez, el hígado de estos animales presenta niveles más bajos de marcadores de inflamación. El fenotipo reportado responde a un aumento en la actividad de SIRT1 en el hígado ante la ausencia de DBC1³⁴. Por otra parte, DBC1 también inhibe la actividad el receptor nuclear LXR- α involucrado en el metabolismo del colesterol principalmente a nivel hepático⁶³. Los autores de este trabajo se aventuran y proponen que en la protección a contraer hígado graso en los animales *Dbc1* KO puede estar involucrada la activación de LXR- α ⁶³.

Los ratones machos *Dbc1* KO, no así las hembras, muestran un incremento en la gluconeogénesis hepática, ante el aumento en la expresión de la enzima PEPCK que cataliza el paso limitante de la vía²³. Esto ocurre porque DBC1 por un lado estabiliza al represor gluconeogénico, la proteína Rev-erb α y por otro inhibe a SIRT1, que tiene un rol inductor de la gluconeogénesis^{10,23,38}. La ausencia de la regulación de estos dos blanco de DBC1 explica el aumento de la síntesis de glucosa en el hígado. Como también sucede en el tejido adiposo blanco, en el hígado de los animales KO se observa aumentada la enzima Scd1³³. La ausencia

de *Scd1* revierte la intolerancia a la glucosa y las diferencias en el peso que se observa en los machos³³.

La importancia de la proteína DBC1 en el contexto metabólico ha quedado más que demostrada. Esta actúa en distintos tejidos sobre varios blancos que regulan la vías metabólicas que mantienen la homeostasis energética a nivel sistémico. El ratón *Dbc1* KO ha sido una herramienta excepcional para entender muchas de las cosas que sabemos hoy en día con respecto a las funciones de la proteína a nivel metabólico. Sin embargo, algunos de los aspectos del complejo fenotipo metabólico que desarrollan estos animales, no han podido ser resueltos de manera concluyente, al menos en parte debido a los múltiples roles de la proteína involucrando distintos órganos y tejidos. En este contexto se hace necesaria la generación de nuevas herramientas que permitan confirmar algunas de las funciones que se le han atribuido a DBC1 y comprender los aspectos que hoy se desconocen. En esta tesis desarrollamos un modelo KO condicional que será una excelente herramienta para abordar estas interrogantes.

Por otra parte, desde organismos unicelulares hasta las células que conforman los tejidos en organismos más complejos, necesitan que exista un balance metabólico favorable para que la célula crezca y se replique con éxito. A su vez, la maquinaria que regula el ciclo celular interacciona con las vías metabólicas para que abastezcan a la célula de los metabolitos necesarios para cada fase del ciclo. En definitiva, los mecanismos que están encargados del control de la progresión del ciclo celular controlan y son controlados por cambios del metabolismo celular y convergen en sus principales vías moleculares de señalización^{64,65}. La proteína DBC1 además de regular procesos metabólicos modula la actividad de moléculas que regulan el ciclo celular. Esto nos lleva a

pensar que la proteína puede ser uno más de los elementos que articulan ambos procesos.

1.5 Ciclo celular

Varios de los factores que son regulados por DBC1 son elementos que a su vez regulan el ciclo celular. Moléculas tales como la β -catenina, p53 y distintos receptores nucleares son determinantes en las decisiones que toma la célula al momento de detener o proseguir con su ciclo replicativo^{15,16,66,67}. En esta tesis estudiamos la dinámica de expresión de DBC1 en el contexto del ciclo celular, y como este puede verse afectado ante la ausencia de DBC1. En función de esto a continuación comentaremos algunas generalidades del ciclo celular para poner en contexto el rol que juega DBC1 en el mismo y el abordaje empleado en nuestro trabajo.

El periodo en que una célula eucariota crece y se divide es un proceso altamente regulado denominado ciclo celular. Una batería de moléculas expresadas y reguladas secuencial y temporalmente, permiten que los distintos eventos del ciclo progresen en el orden y momento adecuado. Los eventos que suceden en cada una de las etapas del ciclo son desencadenados por las quinasas dependientes de ciclinas (Cdks). Las Cdks gatillan las cascadas de señalización y los programas de transcripción génica de cada fase del ciclo mediante la fosforilación de sus distintos blancos. Estas enzimas se vuelven activas al formar heterodímeros con sus subunidades reguladoras, las ciclinas⁶⁸. La expresión y recambio de cada ciclina marcan el paso de avance de las distintas etapas del ciclo celular. Las proteínas reguladoras de las quinasas dependientes de ciclinas, las Kip y Cip son otro nivel de regulación de la actividad de los complejos ciclina/Cdk. Las ciclinas, las quinasas dependientes de ciclinas y las

proteínas inhibidoras de ciclinas son elementos centrales en la regulación del ciclo. Estas dirigen la progresión del ciclo y coordinan la maquinaria celular necesaria para cada fase del mismo. Así también integran distintas señales intracelulares y extracelulares que inducen la detención o progresión del ciclo.

Las células que están ciclando pasan la mayor parte del tiempo en interfase, período que a su vez se subdivide a su vez en tres subfases. La célula crece durante su fase G_1 , duplica sus cromosomas en la fase S y se prepara para la mitosis en la fase G_2 . En cada fase hay puntos de chequeo donde los elementos de control del ciclo verifican que todo está en orden para seguir adelante. El daño al ADN o la falta de estímulos mitogénicos son dos ejemplos de señales que le ponen freno al avance del ciclo.

A medida que la célula atraviesa el ciclo celular, la concentración de las ciclinas oscila y los perfiles de las distintas ciclinas varían según la fase del ciclo. Su concentración intracelular se regula a nivel transcripcional y a nivel de su tasa de recambio. La ciclina D activa Cdk4/Cdk6 que permiten el avance de la célula en G_1 y su entrada a la fase S. Las ciclinas E y A presentan su pico en S y preparan y activan la síntesis de ADN. Por último la ciclina B es la ciclina asociada a la fase M y la formación del huso mitótico. En la figura 1.2 se muestra un esquema de las oscilaciones de las ciclinas durante el transcurso del ciclo celular.

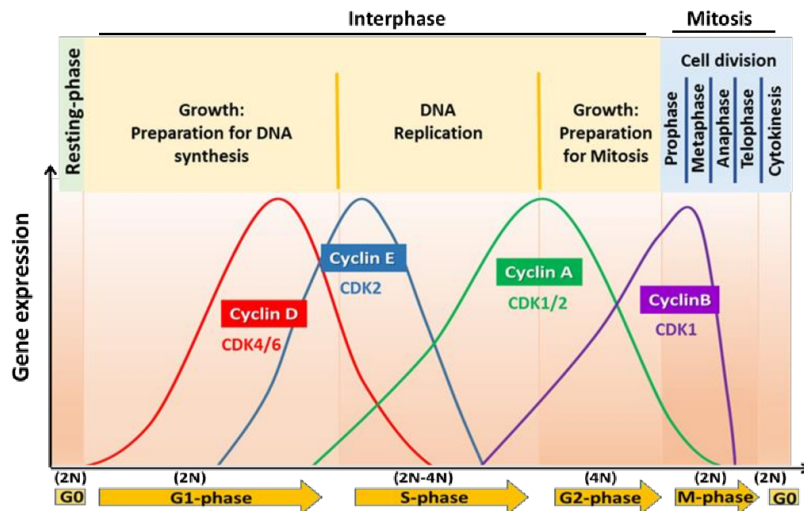


Figura 1.2 Niveles de ciclinas durante el transcurso del ciclo. Extraído de ⁶⁹

Durante la proliferación, las células transitan sucesivamente a través de las distintas fases del ciclo celular, pero según el tipo celular y el contexto fisiológico la célula puede salirse del ciclo, y deja de crecer y dividirse. Existen distintas clases de células no proliferantes. Están la mayoría de las células terminalmente diferenciadas, que pierden definitivamente su capacidad de proliferar. Algunos ejemplos de estas en vertebrados son las células de la epidermis, del sistema nervioso, y las musculares. Por otra parte están las células senescentes las cuales salen del ciclo celular de forma definitiva, aunque se ha visto que en determinadas condiciones pueden volver a ingresar⁷⁰. La senescencia induce cambios profundos a nivel de la cromatina y en la activación de vías moleculares de supresión de tumores⁷⁰. Además pueden presentar un fenotipo altamente secretor liberando citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, conocido como SASP (senescence-associated secretory phenotype). Las células se vuelven senescentes en respuesta a la activación de oncogenes, al daño al ADN y a el estrés oxidativo entre otros factores⁷⁰. La senescencia es mantenida por la activación de vías donde participan las proteínas ATM, ARF, p53, y las proteínas inhibidoras de quinasas dependientes de ciclina p16 y p21⁷⁰.

Por último están las células quiescentes. Entre cada ciclo replicativo la célula puede ingresar en una fase de reposo proliferativo, la denominada fase G_0 . Las células que permanecen en esta fase son células quiescentes. Estas células mantienen su capacidad de reingresar al ciclo en respuesta a estímulos mitogénicos. Las células madres y algunos tipos de células diferenciadas como los hepatocitos y los fibroblastos son ejemplos de células quiescentes.

Durante la quiescencia los niveles de las diferentes ciclinas se mantienen bajos. La proteína supresora de tumores Rb mantiene secuestrado al factor de transcripción E2F. Este factor de transcripción activa la expresión génica de los genes necesarios para la síntesis del ADN durante la fase G1. Ante estímulos mitogénicos se induce la expresión de ciclina D que oligomeriza con Cdk4. La Cdk4/ciclina D fosforila a la proteína Rb que se desprende de E2F levantando la inhibición de su actividad⁷¹. La proteína p27Kip es indispensable para mantener a las células quiescentes^{72,73}. Esta es expresada a en altos niveles durante G_0 y se encarga de inhibir la actividad del complejo Cdk4/ciclina D. Otra de las proteínas que participa en el ingreso y mantenimiento de las células en quiescencia es el supresor tumoral p53⁷⁴.

Este último es uno de los blanco moleculares regulados por DBC1 y que en conjunto con otros participan en los distintos mecanismos de regulación del ciclo celular mediados por DBC1 que describiremos a continuación.

1.6 DBC1 y ciclo celular

Como lo mencionamos antes, varios de los factores que son regulados por DBC1 están vinculados con la regulación del ciclo celular. DBC1 regula la actividad de p53, estabilizándola por distintas vías^{12,66,75}. Se ha reportado que la interacción directa de DBC1 sobre p53 inhibe la proliferación celular⁶⁶. Por otra parte DBC1 inhibe la actividad catalítica de la metiltransferasa de histonas

SUV39H1¹⁸. Esta metiltransferasa reprime la expresión de genes de la fase S durante G_0 y el comienzo de G_1 ⁷⁶. También se ha demostrado que DBC1 interacciona con BRCA1 reprimiendo su actividad transcripcional¹⁴. BRCA1 participa en varios de los puntos de chequeo durante la progresión del ciclo celular⁷⁷. Las personas portadoras de mutaciones en el gen *BRCA1* presentan mayores riesgos de contraer cáncer de mama, de ovario y colorrectal⁷⁸. DBC1 interacciona también con los receptores de estrógeno ER α y ER^{17,79}. Estos receptores además de activar programas genéticos que inducen la proliferación, interaccionan con varios factores de la maquinaria molecular que orquesta el ciclo celular⁸⁰. Otro receptor nuclear que interacciona y es estabilizado por DBC1 es el receptor de andrógenos AR que impulsa la progresión de la fase G_1 y la entrada a la fase S del ciclo celular^{15,81}. La proliferación activada por la vía Wnt es por un lado inducida por DBC1 mediante su interacción con β -catenina y por otro inhibida mediante su interacción con el supresor tumoral MCC^{67,82}.

Sumado a todos los interactores de DBC1 antes mencionados está el lncRNA MALAT1, que también participa en procesos proliferativos. La interacción entre DBC1 y este lncRNA estimula la proliferación celular inhibiendo la apoptosis mediada por p53^{13,22}. Por otra parte MALAT se encuentra incrementado durante la salida de G_0 de los hepatocitos en el proceso de regeneración hepática e induce la expresión de la ciclina D1 lo que promueve la progresión del ciclo y la transición G_1/S ²¹. En resumen, la proteína DBC1 interacciona y regula una amplia gama de moléculas encargadas de mantener el ciclo celular funcionando ordenadamente.

Cuando la actividad de los reguladores del ciclo celular se encuentran alterados y los mecanismos que evitan que la célula se divida en condiciones inadecuadas no funcionan correctamente se da lugar a la aparición de eventos oncogénicos.

En ese sentido se ha encontrado que DBC1 puede estar también involucrado en este tipo de procesos.

1.7 DBC1 y cáncer

Como mencionamos antes, DBC1 actúa como supresor tumoral en algunos casos y como promotor en otros. Varios trabajos se han realizado cruzando los datos de la expresión de DBC1 en tumores con las presentaciones clínicas de los pacientes. Hay estudios que la identifican como posible supresor tumoral en casos de cáncer colorrectal⁸³. En otros casos se indica una correlación entre los altos niveles de expresión de DBC1 y una peor evolución de los pacientes⁸⁴. También en modelos de este tipo de cáncer se observa que la ausencia de DBC1 genera una disminución en el crecimiento de líneas tumorales, y que los tumores inducidos con estas líneas presentan un menor volumen²⁸. En cambio, en un estudio donde se analiza tejido tumoral de 104 pacientes con carcinomas de vesícula biliar, la alta expresión de DBC1 correlaciona con una mayor supervivencia de los pacientes⁸⁵. Sin embargo también hay trabajos donde se analiza la expresión en tumores de cáncer de mama la alta expresión de DBC1 está asociada a una peor evolución de la enfermedad^{86,87}. Para el caso de cáncer gástricos distintos trabajos también arrojan resultados contradictorios. En algunos casos se asocia la expresión de DBC1 con mayor supervivencia y mejor pronóstico vinculada con una menor invasión linfática^{88,89}. En tanto en otros casos se asocia un aumento en la expresión de la proteína con mayor riesgo de desarrollar metástasis y una disminución en la supervivencia de los pacientes^{86,90}. En definitiva, las funciones que cumple DBC1 en procesos oncológicos no están claras, y parecen depender del tipo de tumor que se esté estudiando.

Una explicación a las diferencias observadas en los distintos estudios pueden deberse a la función que cumple DBC1 en la estabilización de la proteína p53⁶⁶. Esta proteína es uno de los supresores tumorales más estudiados, y se han

detectado mutaciones de p53 en distintos tipos de cáncer⁹¹. Muchas de estas mutaciones producen la pérdida o ganancia de funciones en p53 que conducen a un aumento en el crecimiento tumoral⁹². Se ha encontrado que DBC1 mantiene la capacidad de estabilizar algunas de estas formas aberrantes de p53 lo que podría explicar las contradicciones que se observan en la función de DBC1 en células tumorales⁶⁶. Esta posibilidad ha sido evaluada en un estudio donde utilizaron datos de pacientes disponibles en la base de datos de TCGA (*The cancer genome atlas*). Cuando correlacionan la expresión de p53 mutante con niveles bajos de expresión de DBC1 se observa una mejora en la supervivencia libre de enfermedad en pacientes con gliomas. Lo mismo sucede en pacientes que no presentan mutaciones en p53 y expresan altos niveles de DBC1².

Algunas modificaciones postraduccionales de DBC1 modifican su función en las células cancerosas. La acetilación de DBC1 inducida por el sulfurafano inhibe la expresión de genes oncogénicos en modelos de cáncer colorectal²⁸. En modelos de carcinomas gástricos la fosforilación de DBC1 está asociada con un aumento en la proliferación e invasividad de células tumorales²⁷. En cambio, el aumento de los niveles de DBC1 fosforilada está asociada con una peor prognosis en los pacientes con cáncer gástrico²⁷. La fosforilación por la quinasa CK2 α aumenta la proliferación y la invasividad de células tumorales²⁷.

Cabe mencionar que también se ha visto que la proteína mutada en cáncer colorrectal (MCC) inhibe la expresión de oncogenes manteniendo al complejo DBC1/ β -catenina fuera del núcleo celular, lo que enseña que la regulación de DBC1 por otras proteínas es otro factor a tener en cuenta en los estudios de DBC1 vinculados al cáncer⁹³.

La gran mayoría de los estudios donde se describen a los interactores de DBC1 y la regulación de su unión fueron realizados utilizando líneas tumorales y transformadas, y en sistemas donde se sobreexpresa a DBC1. Este tipo de

abordajes presenta algunas limitaciones. Por un lado la sobreexpresión de las proteínas hace que sus concentraciones se encuentren muy alejadas de las condiciones fisiológicas lo que puede afectar la dinámica de unión a sus blancos moleculares. La otra desventaja es que las células transformadas y tumorales presentan alteraciones en sus mecanismos de control del ciclo celular. DBC1 interacciona con varios elementos de los mecanismos de regulación del ciclo celular, por lo que se vuelve sumamente relevante realizar estudios que investiguen su dinámica en células que mantienen estos mecanismos funcionales. En este trabajo, hicimos también foco en comprender cómo puede estar siendo regulada la actividad de DBC1 durante el transcurso del ciclo, estudiando células proliferantes y quiescentes, que mantienen la fisiología normal de su ciclo celular.

Hipótesis de trabajo

DBC1 juega un rol importante en la regulación del ciclo celular. Proponemos que variaciones en su expresión, disponibilidad y actividad son necesarias, durante el transcurso del ciclo.

Además, proponemos que DBC1 regula la secreción de factores solubles en el tejido adiposo, y que estos actúan localmente y a distancia mediando los fenotipos observados en los animales *Dbc1* KO.

Finalmente nuestra principal hipótesis de trabajo, es que la proteína DBC1 limita la capacidad expansiva del tejido adiposo. Esta capacidad es clave en la protección a desarrollar trastornos metabólicos. Los animales KO para DBC1 presentan un fenotipo metabólico complejo, que resulta de la interacción entre distintos tejidos. En este sentido el ratón *Dbc1* KO, no nos permite aislar la contribución de la proteína en distintos tejidos ni distinguir su carga relativa en el establecimiento de la obesidad saludable. La utilización de un modelo animal KO tejido específico puede ser una gran ayuda para responder estas interrogantes.

2. Objetivos

Objetivo General

Profundizar en la comprensión del rol de la proteína DBC1 en la regulación del metabolismo energético y el ciclo celular.

Objetivos específicos

- 1- Comprender los mecanismos de regulación de la actividad de DBC1
- 2- Buscar mediadores de la señalización paracrina y endocrina que estén regulados por DBC1
- 3- Generar un ratón KO condicional para DBC1 que nos permita estudiar la función de la proteína en distintos tejidos

3. Materiales y métodos

3.1 Modelos animales

Los ratones utilizados en los experimentos que se presentan en esta tesis se mantuvieron en las instalaciones de la unidad de animales transgénicos y de experimentación (UATE) del Instituto Pasteur de Montevideo. Todos los protocolos utilizados para los experimentos realizados con animales fueron aprobados por la Comisión de Ética de Uso Animal (CEUA) del Instituto Pasteur de Montevideo, en el marco de la ley nacional 18.611 y siguiendo las guías internacionales de cuidado animal ⁹⁴. Los estudios se realizaron según los métodos aprobados para cada protocolo. Todos los modelos animales que se usaron en este trabajo WT, *Dbc1* KO, *Dbc1* cKO, y Adipoq-cre/ERT2 se encontraban en un fondo puro C57BL6/J (B6). Los animales se retrocruzaron por animales C57BL6/J durante más de 10 generaciones para garantizar un fondo genético homogéneo. Los animales se mantuvieron en cajas ventiladas (Tecniplast, Milan, Italy) con camas de madera chipeada en un ambiente controlado a 20 ± 1 °C, una humedad relativa de 40-60%, en ciclos de luz oscuridad 14/10. La administración de la ración (LABDIET 5K67, PMI Nutrition, IN, USA) y el agua se realizó *ad-libitum*.

3.1.1 Generación de ratón *Dbc1* cKO

Los procedimientos para generar al animal transgénico fueron realizados dentro del bioterio libre de patógenos específicos (SPF) de la UATE en el Instituto Pasteur de Montevideo (CEUA 007-18). Las microinyecciones citoplasmáticas fueron realizadas en cigotos de animales B6DF2 o B6 utilizando una mezcla de 100 ng/ μ l de ARNm de las Cas9, 25 ng/ μ l de cada ARNg y 50 ng/ μ l diluidos en amortiguador de microinyección. Los embriones viables fueron cultivados toda la noche (ON) en gotas de medio M16 cubiertas con

aceite mineral, adicionado con SCR7 un inhibidor para la ligasa IV, mantenidos en una atmósfera 5% CO₂ a 37°C. Al día siguiente, los embriones en el estadio de dos células fueron transferidos al oviducto de hembras B6D2F1 pseudo preñadas 0.5 días post-coito según el protocolo descrito en ⁹⁵. En este procedimiento se transfirieron un promedio de 20 embriones por hembra. La preñez se determinó por inspección visual.

A los 21 días luego del nacimiento de las crías se les realizaron biopsias para su genotipado y los animales con el genotipo adecuado se los mantiene como fundadores.

De la primera ronda de microinyecciones solo se logró obtener animales con la inserción del sitio 3' *loxP*. Estos animales fueron utilizados para producir embriones por fertilización *in-vitro* utilizando el protocolo CARD como está descrito en ⁹⁶. Tres horas después de la fertilización los cigotos fueron sometidos al mismo procedimiento que se describe más arriba para la primera ronda de microinyección.

3.1.2 Modelo de regeneración hepática

Seguimos el proceso de regeneración hepática realizando hepatectomías parciales de hígado a ratones B6 y *Dbc1* KO. El protocolo fue realizado según lo descrito en la literatura ⁹⁷ y bajo el protocolo Nro. 09-16 aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del Instituto Pasteur de Montevideo. Brevemente, se utilizaron ratones machos entre las 8 y 14 semanas de vida, a los que se les anestesió transitoriamente utilizando isofluorano. La anestesia se mantiene durante todo el procedimiento quirúrgico mediante la utilización de un cono nasal. Manteniendo condiciones asépticas se realiza una incisión que deja expuesta la cavidad abdominal y el hígado con sus cuatro lóbulos. Utilizando hilo de sutura de seda se realiza un lazo alrededor de la

base del lóbulo medio y otro alrededor de la base del lóbulo izquierdo como se muestra en la figura 2.1. Se procede luego a seccionar ambos lóbulos justo por debajo de los lazos y a luego a cerrar el peritoneo mediante hilo de sutura de seda y la piel mediante clips quirúrgicos. Los ratones sham son sometidos sólo a la incisión que les deja abierta la cavidad abdominal. Los animales operados son sacrificados a distintos tiempos luego del procedimiento y el tejido hepático remanente es pesado luego de la disección del mismo y previo a su procesamiento.

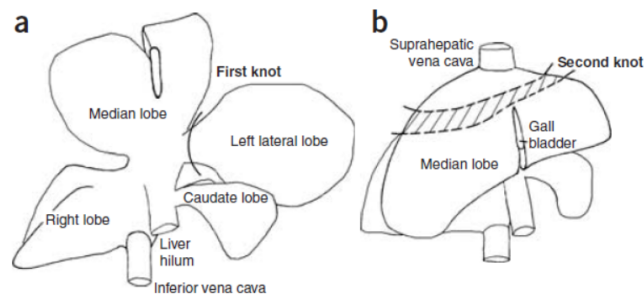


Figura 2.1 Esquema ilustrativos de la anatomía del hígado del los ratones donde se indica los sitios donde se realizan los nudos previo a la remoción quirúrgica del lóbulo izquierdo y el medio

3.2 Modelos celulares

En todos los experimentos el crecimiento y mantenimiento de células fue llevado a cabo en condiciones estándar, en cámara húmeda a 37°C y 5% de CO₂. Para los cultivos con líneas celulares se utilizó DMEM (Thermo Fisher Scientific) con 4,5 g/l de glucosa y GlutaMax. Suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 10 mM HEPES y penicilina estreptomycin. Para el caso de los cultivos primarios de preadipocitos de ratón las células fueron crecidas en α -MEM

(Thermo Fisher Scientific) con 1 g/l de glucosa. Suplementado con 10% SFB, 2 mM de glutamina, 10 mM HEPES y penicilina estreptomina.

Las líneas celulares utilizadas fueron las HepG2 (ATCC, HB-8065) derivadas de hepatocarcinoma humano, 3T3-L1 (ATCC, CL-173) derivadas de fibroblastos de ratón, HEK293T (ATCC, CRL-1573) derivadas de tejido embrionario de riñón humano.

Los cultivos primarios fueron realizados a partir de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs). Su obtención fue llevada a cabo según el protocolo descrito en *Current Protocols in Molecular Biology*⁹⁸ y bajo el protocolo Nro 014-14 aprobado por la Comisión de ética en el uso de animales del Instituto Pasteur de Montevideo. Hembras C57BL6/J *WT* y *Dbc1 KO* a los catorce días de preñez son anestesiadas mediante inyección intraperitoneal de ketamina-xilacina y eutanasiados mediante dislocación cervical, y se les extrae el útero manteniendo condiciones asépticas. A partir de este punto se trabaja en cámara de flujo laminar donde se extraen los embriones del útero y se les disecciona la cabeza, corazón e hígado, este material es descartado y se sigue trabajando con el resto del tejido embrionario. Se procede a trocear en fragmentos de 3 x 3 mm al tejido y se incuban en un falcon esteril con tripsina 0,25% a una razón de 3 ml por feto. Luego de una incubación *overnight* se remueve la mayor parte de la tripsina y se incuba el tubo durante 30 min a 37°C. Luego de esta incubación se agrega medio completo de cultivo y se procede a disgregar mecánicamente por pipeteo y se siembran la suspensión células a razón de 5 placas de 100 mm por embrión.

3.3 Técnicas de biología molecular y bioquímica

3.3.1 Western Blot

3.3.1.1 Procesamiento de muestras

Las muestras de células y tejido hepático fueron procesadas utilizando amortiguador de lisis NTEN (20 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% IGEPAL 0.5%) suplementado con 5 mM NaF, 5 mM Nicotinamida, 50 mM β -glicerol fosfato e inhibidor de proteasas (Merk, S8830). Las muestras de tejidos adiposo y adipocitos fueron procesadas utilizando amortiguador de lisis RIPA (50 mM Tris, 150mM NaCl, 1% IGEPAL , 0.5% Desoxicolato de sodio ,0.1% SDS , pH 7,4) suplementado con 5 mM NaF, 5 mM Nicotinamida, 50 mM β -glicerol fosfato e inhibidor de proteasas.

Los pellet secos de células son resuspendidos en 100-200 μ l amortiguador de lisis pipeteando repetidas veces para lograr una correcta homogeneización. Los tubos son mantenidos 20-30 min a 4°C y agitados vigorosamente cada 5 min. Los restos celulares son sedimentados a 12000 g durante 10 min a 4°C. A la fracción soluble se la reserva y realiza cuantificación de proteína por el método de Bradford.

Para el caso de los hígados, se parte de entre 50-100 mg de tejido que es lisado en 500 μ l de amortiguador de lisis y troceados con tijera. Los tejidos fueron lisados utilizando dos métodos según el experimento y la cantidad de muestras: por cavitación, utilizando un sonicador de sonda Misonix XL2020 durante 30 seg, 1 seg on, 3 seg off a una amplitud del 30%. O utilizando un homogeneizador tipo molino de perla (Bullet Blender, Next Advance), 3 min velocidad 10 con perlas de acero inoxidable de 1 mm de diámetro. Luego de la homogeneización se procede igual que con las células reservando la fracción soluble.

El tejido adiposo y los adipocitos son procesados utilizando el mismo protocolo que se utiliza para el hígado con modificaciones. Luego de sedimentar los restos celulares, sobre la superficie de la fracción soluble se forma una torta lipídica. La fracción soluble es tomada con cuidado atravesando la torta lipídica intentando mezclar las dos fases lo menos posible. La fracción soluble es nuevamente centrifugada para intentar separar la fracción lipídica lo mejor posible y la fracción soluble acuosa se reserva y se le mide concentración de proteínas.

Todo el procesamiento de las muestras se realiza manteniendo temperaturas bajas utilizando baños de hielo y refrigeración de los equipos. Las fracciones solubles son almacenadas a -20°C o -80°C hasta el momento de su utilización.

3.3.1.2 Preparación de las muestras para electroforesis

Las muestras obtenidas en los pasos anteriormente descritos son cuantificadas utilizando diluciones adecuadas para que su concentración caiga en el rango de 0,1-1 mg/ml de proteína. La cuantificación se realizó en placas de 96 pocillos utilizando reactivo de Bradford (AppliChem, A6932) y utilizando una curva de concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina (BSA) de entre 0,1-1 mg/ml. La cuantificación se realiza en lector de placas midiendo absorbancia a 595 nm.

Finalmente preparamos a nuestras muestras a una concentración de entre 1-2 mg/ml en amortiguador de carga Laemmli para SDS-PAGE (200 mM Tris, 2% SDS, 5% Glicerol y 5% β -mercaptoetanol, 0,001% Azul de bromofenol pH 6,8). Para favorecer la desnaturalización las muestras son hervidas durante 5 min. Las muestras preparadas en amortiguador de carga son almacenadas a -20°C hasta su utilización.

3.3.1.3 SDS-PAGE y Western Blot

Las muestras para los inmunoblots fueron corridas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE). Se utilizaron geles con concentraciones de entre 8,5-15% de acrilamida según la proteína que se quiere detectar. Se utilizó amortiguador TGS (25mM Tris pH 8,3, 192 mM glicina, 0,1% SDS). Las corridas fueron realizadas a un amperaje constante de 30 mA y la duración de las mismas depende del tiempo en que el frente de corrida alcanza el final del gel. Las proteínas fueron transferidas utilizando un sistema de transferencia húmedo con amortiguador TGS 20% EtOH, durante 1-2 h a 400 mA dependiendo del % de acrilamida del gel y si se transfieren uno o dos geles. Se utilizaron membranas de PVDF (*Polyvinylide fluoride*).

Luego de la transferencia se bloquea a la membrana con una solución de bloqueo compuesta por TBS-T (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 0,2% Tween-20) 5 % de leche descremada, durante 0,5-1 h a temperatura ambiente (TA) bajo agitación. La solución de bloqueo se enjuaga con TBS-T. Las membranas se incuban *over-night* O.N a 4°C bajo agitación constante con la solución de anticuerpo adecuada.

Luego de la incubación con el anticuerpo se realizan 3 lavados con TBS-T de 5 min a TA bajo agitación constante. A continuación se procede a incubar a la membrana con la solución de anticuerpo secundario conjugado a HRP, que reconoce al anticuerpo primario utilizado previamente, en una dilución 1/10000 en TBS-T durante 45 min a TA. Luego se repite el ciclo de 3 lavados con TBS-T y se procede al revelado por quimioluminiscencia utilizando Super Signal West Pico Chemiluminescent Kit (Pierce 34080). La señal de quimioluminiscencia se registró para algunos casos en placas fotográficas por revelado manual y en otros utilizando el fotodocumentador Image Quant 800.

En caso de querer detectar otras proteínas en la misma membrana se realiza el protocolo de *striping* incubando la membrana con 7 M de cloruro de guanidina durante 15 min. Se enjuaga la guanidina con agua destilada y luego con TBS-T y se reinicia con el protocolo a partir del bloqueo de la membrana con TBS-T 5% leche.

Los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo fueron anti-DBC1 C-term (Bethyl A300-434;A303-942) y N-term (Bethyl A300-432), anti-SIRT1 (Cell Signalling, #9475), anti-ciclina D1 (Abcam, A5441), A2 (Abcam, ab181591), anti- α -tubulina (Merck, T6074), anti-GAPDH (Abcam, ab9485), anti-FLAG (Sigma F3165), anti-FSTL1 (R&D, AF1738)

3.3.2 Espectrometría de masas

3.3.2.1 MALDI TOF para mapeo del sitio de corte de DBC1

Las proteínas inmunoprecipitadas fueron resuspendidas en tampón Laemmli 2X y corridas en SDS-PAGE al 8,5% en condiciones estándar. A continuación, los geles se tiñen con azul de Coomassie coloidal y las bandas seleccionadas se escindieron manualmente y se procesan para análisis de espectrometría de masas según el protocolo descrito en ⁹⁹. Brevemente, se realiza una digestión con tripsina (grado de secuenciación, Promega) en gel durante la noche a 37°C. Los péptidos resultantes se extraen con acetonitrilo acuoso al 60%, ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% y son secados al vacío. Luego péptidos trípticos se desalan utilizando microcolumnas C18 (puntas de pipeta OMIX, Agilent) y se eluyen con solución de matriz (solución saturada de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en acetonitrilo al 60% TFA al 0,1%) directamente sobre la placa de muestra MALDI. Los espectros de masas fueron adquiridos en un instrumento 4800 MALDI TOF / TOF (Abi Sciex) en modo reflector positivo y se calibraron externamente usando una mezcla de péptidos estándar (Applied

Biosystems). Los péptidos seleccionados se analizaron adicionalmente mediante MS / MS. La identificación de proteínas se realizó mediante la búsqueda en la base de datos SwissProt (2017_09; secuencias 555594) utilizando el programa MASCOT (Matrix Science). Se utilizaron los siguientes parámetros de búsqueda: tolerancia de masa monoisotópica, 0,05 Da; tolerancia a la masa del fragmento, 0,6 Da; oxidación de metionina y carbamidometilación de cisteínas como modificaciones variables; salteo de hasta un corte triptico.

3.3.2.1 LC-MS/MS para el analisis de secretomas

Las proteínas precipitadas de los medios condicionados fueron resuspendidas en amortiguador Laemmli. Se cuantificó a las proteínas corriendo geles de SDS-PAGE 12%. Los geles fueron teñidos con azul de coomassie coloidal y los carriles analizados por densitometría utilizando una curva estándar con concentraciones conocidas de proteínas.

Se sembraron cantidades iguales de proteína total de las distintas condiciones y réplicas en geles al 12% de poliacrilamida para realizar SDS-PAGE. Las muestras fueron corridas aproximadamente 3 cm en el gel separador. Las proteínas fueron fijadas en el gel con una solución de etanol 50%/Acético 12% . El gel se tiñó ligeramente con azul de Coomassie coloidal para cortar con mayor facilidad los distintos carriles. A su vez cada carril fue seccionado en cinco pedazos. Cada uno de estos fragmentos fue tratado por separado. Los geles fueron desteñidos con amortiguador AMBIC 100 mM pH 8/ ACN 50% . Se trató a las muestras con DTT 10 mM para reducir sus cisteínas y luego las mismas fueron alquiladas con IAA 55mM. La digestión de las proteínas se realizó en gel con tripsina (Promega) en una relación proteína:enzima 1:50 (m:m), en bicarbonato de amonio 50 mM, pH 8.0, a 37 °C durante toda la noche y luego se

extrajeran los péptidos con ácido trifluoroacético 0.1% en acetonitrilo (ACN) 60%.

Las muestras se secaron al vacío, se resuspendieron en ácido fórmico (AF) 0.1% y se limpiaron de sales y partículas usando micro-columnas C18 Ziptip® (Millipore).

Los péptidos trípticos se separaron usando un nano-HPLC (UltiMate 300, Thermo Fisher Scientific) acoplado a un espectrómetro de masa híbrido Q-Orbitarp (QExactive Plus, Thermo Fisher Scientific). Las mezclas de péptidos fueron cargadas en una pre-columna Acclaim PepMap™ 100 C18 (75 µm x 2 cm, 3 µm, Thermo Fisher Scientific) y separadas en una columna analítica PepMap™RSLC C18 (75 µm x 50 cm, 2 µm, 100 Å, Thermo Fisher Scientific) a un flujo constante de 250 nL/min y 40°C. La columna se equilibró con 1% de la fase móvil B (A: AF 0,1%; B: AF 0,1% en ACN) seguido de un gradiente de elución: 1%-10% B 30 minutos, 10%-35% B 120 minutos, 35%-50% B 30 minutos, 50%-99% B 3 minutos. Se corrieron dos réplicas técnicas para cada muestra.

Análisis de los datos generados por LC-MS/MS

Los datos generados por nano-HPLC MS/MS se analizaron con el software libre PatternLab for proteomics (PatternLab) 4.0¹⁰⁰. Para la búsqueda se generó una base de datos de proteínas de *Mus musculus* (Uniprot, <http://www.uniprot.org/>; 23/09/2019) a la que se adicionaron los contaminantes más frecuentes en experimentos de proteómica y la secuencia reversa de cada proteína, estas últimas fueron usadas como señuelos para el cálculo de la tasa de falso descubrimiento (FDR). La búsqueda se realizó utilizando los siguientes parámetros: tolerancia del valor de m/z del ion precursor de 40 ppm; oxidación de metionina como modificación variable y carbamidometilación de cisteínas como modificación fija. Se permitió un máximo de 2 sitios de corte salteados y

un máximo de 2 modificaciones variables por péptido. Los resultados de las búsquedas se filtraron mediante el módulo Search Engine Processor (SEPro) del PatternLab para obtener listas de identificación con un valor de FDR $\leq 1\%$ a nivel de proteínas.

El módulo de diagrama de Venn del PatternLab se usó para determinar las proteínas detectadas de manera única en cada condición biológica con $P < 0.05$. El módulo TFold del PatternLab se usó para detectar proteínas presentes en ambas condiciones, pero con una abundancia relativa significativamente diferente¹⁰¹. La abundancia de cada proteína se obtuvo cuantificando por conteo de espectros. Se consideraron las proteínas presentes en 5 réplicas del total de 8 en ambas condiciones y se consideraron en los análisis sólo las proteínas que aparecían como proteínas revisadas en la base de datos Uniprot.

3.3.3 Medidas de actividad SIRT1

La actividad de SIRT1 se determinó con un kit fluorométrico (Enzo Life Sciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este ensayo utiliza como sustrato un tetrapéptido acetilado en su lisina, correspondiente a K382 de p53 (péptido Fluor de Lys). El residuo de lisina es desacetilado por SIRT1, tras el agregado de una concentración conocida de NAD^+ . Las muestras se homogeneizaron en amortiguador NETN. Los homogeneizados se incubaron durante 10 minutos a 37°C para permitir la degradación del NAD^+ endógeno. Los valores de fluorescencia obtenidos en ausencia de NAD^+ no difirieron del blanco. Se utilizaron inhibidores de SIRT1 nicotinamida (2 mM), suramina (100 μM) y sirtinol (100 μM) para confirmar la especificidad de la reacción. A continuación, se añadió DTT 10 mM al medio y los homogeneizados se incubaron de nuevo durante 10 minutos a 37°C . Los homogeneizados (20-30 μg de proteína / pocillo) se incubaron en tampón de ensayo SIRT1 en presencia de sustrato 100 μM Fluor de Lys-SIRT1 (Enzo Life Sciences) y 5 μM TSA para

determinar la actividad independiente de SIRT1, o con Sustrato 100 μM de Fluor de Lys – SIRT1, TSA 5 μM y NAD⁺ 200 μM para determinar la actividad dependiente de SIRT1. Después de 1 hora de incubación a 37°C, se terminó la reacción añadiendo una solución que contenía Revelador Fluor de Lys (Enzo Life Sciences) y nicotinamida 2 mM. Las placas se incubaron a 37 ° C durante 1 hora. Los valores se determinaron en un lector de placas fluorométrico (Spectramax Gemini XPS; Molecular Devices) con una longitud de onda de excitación de 360 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm. El cálculo de la fluorescencia neta incluyó la sustracción de un blanco que consiste en tampón que no contiene NAD⁺ y la actividad de cada condición se expresa como porcentaje respecto a la actividad del control. La actividad dependiente de SIRT1 se calculó después de restar los valores de fluorescencia obtenidos en ausencia de NAD⁺. En todos los casos, confirmamos la linealidad de la reacción a lo largo del tiempo

3.4 Análisis estadístico

Los valores se presentan como media \pm SEM o SD de 3-5 experimentos, a menos que se indique lo contrario. Para los experimentos de regeneración hepática, los resultados se analizaron mediante ANOVA de una y dos vías. En todos los casos se utilizaron al menos 3-4 animales por condición experimental. El número exacto de ratones en cada experimento se especifica en las leyendas de las figuras correspondientes. Al comparar dos condiciones experimentales diferentes, se utilizó la prueba t de Student de 2 colas. Se consideraron estadísticamente significativos valores de $p < 0,05$.

4. Corte proteolítico de la proteína DBC1 como mecanismo de regulación de su actividad biológica

Como mencionamos en la introducción DBC1 es una proteína que interacciona con otras moléculas, mayoritariamente proteínas, regulando su actividad biológica. Buena parte de los interactores que se unen a DBC1, lo hacen en su extremo amino terminal (Fig. 1.1). En particular, varios de los procesos en los que participa DBC1 se dan mediante la regulación de la enzima SIRT1. De hecho, la interacción con esta desacetilasa, es la única que ha sido constatada *in-vivo*^{32,34}. La interacción con los demás interactores de DBC1 siempre ha sido demostrada en trabajos donde se utilizaron modelos de sobre-expresión de las proteínas en cultivos celulares, utilizando líneas transformadas que por lo general presentan alteraciones en los mecanismos de regulación del ciclo celular.

Respecto a la regulación de la actividad DBC1, todavía nos queda mucho por entender sobre los mecanismos que participan de la misma. Nosotros proponemos que su actividad biológica debe ser regulada durante las distintas etapas del ciclo. Se han reportado algunas acetilaciones y fosforilaciones que regulan su capacidad de unión con sus blancos moleculares. También contábamos con la regulación de la actividad DBC1 según el estatus energético de la célula. Incluso sabíamos que la interacción entre DBC1/SIRT1 se ve disminuida en células hepáticas en condiciones de privación energética^{24,32,34,102,103}. Teniendo todo esto cuenta a continuación procedemos a presentar datos que demuestran la regulación proteolítica de DBC1 y el efecto que esta regulación tiene sobre la actividad de SIRT1.

4.1 Resultados

Identificación de una nueva forma de DBC1 que es regulada durante el ciclo celular

Para comprender mejor cómo se comporta la proteína en células que no presentan alteraciones en su mecanismos de regulación del ciclo celular, estudiamos la dinámica de expresión de DBC1 endógena en células no transformadas. Realizamos una serie de experimentos in-vitro donde utilizamos fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) en sus primeros cinco pasajes. A medida que se acumulan pasajes, estas células disminuyen drásticamente su capacidad replicativa. Nos interesaba saber cómo es la expresión de DBC1 en células proliferantes o quiescentes. Para esto último, crecimos MEFs en medio libre de suero fetal bovino (SFB). En ausencia de los estímulos proliferativos provistos por el suero, las MEFs entran en reposo, sincronizando su ciclo, e ingresando en la llamada fase G_0 del ciclo celular. En este estadio la expresión de ciclinas es mínima. Como marcador molecular de la salida y entrada a G_0 decidimos utilizar ciclina D1, dado que es la primera que aumenta su expresión en la salida de G_0 .

Cuando analizamos por western blot los niveles de DBC1 en células proliferando y células quiescentes observamos, en estas últimas, una banda de menor peso molecular con respecto al peso esperado para la DBC1. En la figura 4.1A observamos la aparición de la banda de bajo peso molecular que apreciamos solo en células quiescentes. Esta banda en los western blots la detectamos cuando utilizamos un anticuerpo que reconoce el extremo carboxilo terminal de DBC1 y no la vemos usando un anticuerpo contra los primeros aminoácidos en el extremo amino terminal. La forma de bajo peso molecular, de

ahora en más denominada DN-DBC1, era evidente tras haber pasado entre seis y doce horas de incubación en medio sin SFB, y se mantenía así durante el tiempo que las células estaban quiescentes (Fig. 4.1B). Al ingresar las células en quiescencia observamos la disminución en niveles de ciclina D1, como era de esperarse, y estos niveles se mantuvieron bajos mientras las células estaban arrestadas en el ciclo. En estos experimentos también observamos de manera clara cómo la expresión de DN-DBC1 se da a expensas de la desaparición de DBC1. En suma, estos resultados demuestran que durante el arresto celular en G_0 las células MEF expresan a la proteína DN-DBC1 que es detectable en western blot utilizando anticuerpos específicos para la porción carboxilo terminal de DBC1.

Teniendo en cuenta la importancia de la regulación de la actividad SIRT1 mediada por DBC1, medimos la actividad de SIRT1 en MEF proliferantes y quiescentes. Encontramos que el aumento en la expresión de DN-DBC1 coincidía con un aumento en la actividad de SIRT1, en células MEF quiescentes respecto a células proliferando (Fig. 4.1C). Esto nos sugiere que DN-DBC1 no inhibe la actividad de la desacetilasa como si lo hace DBC1.

De manera recíproca, cuando agregamos SFB al medio de cultivo de células quiescentes, induciendo su proliferación, vimos que la forma DN-DBC1 es totalmente reemplazada por la DBC1 (Fig. 4.1D). En este caso también vimos como los niveles de ciclina D1 y A2 aumentan inmediatamente después que el SFB es restituido, lo que es indicativo de la salida de las células de G_0 . Cuando medimos la actividad de SIRT1 en estas condiciones observamos una disminución en su actividad en células que ingresaron al ciclo, en comparación con la actividad de la enzima en células quiescentes. Esto coincidió con el reemplazo de la forma DN-DBC1 por la forma completa de DBC1 (Fig. 4.1). Este efecto de cambio de actividad de SIRT1 dependiente del estado proliferativo

celular no fue significativo al medir la actividad SIRT1 en las MEFs *Dbc1* KO (Figura 4.E). Estos resultados indican que la actividad SIRT1 es modulada durante la quiescencia y la proliferación celular, según los niveles de expresión de las formas DN-DBC1 y DBC1. Además la disminución en la actividad de SIRT1 que se observa en células proliferantes es dependiente de la presencia de DBC1.

También vale destacar que en estos experimentos cuando comparamos los niveles de las ciclinas en las distintas condiciones, vimos que en las MEF *Dbc1* KO los niveles de ciclina D1 tardaron más tiempo en disminuir cuando se mantuvieron a las células en medio libre de suero. En la dirección opuesta, cuando restauramos el SFB en los medios observamos que las células KO presentaron un retraso en el aumento de los niveles de ciclina D1. Para el caso de la ciclina A2 también observamos diferencias en las cinéticas de expresión al restaurar el SFB (Fig. 4.1). Estas variaciones en los patrones de expresión de las ciclinas indican que las células que carecen de *Dbc1* presentan alteraciones en la progresión de su ciclo que se ven evidenciadas en la dinámica de expresión de ciclinas.

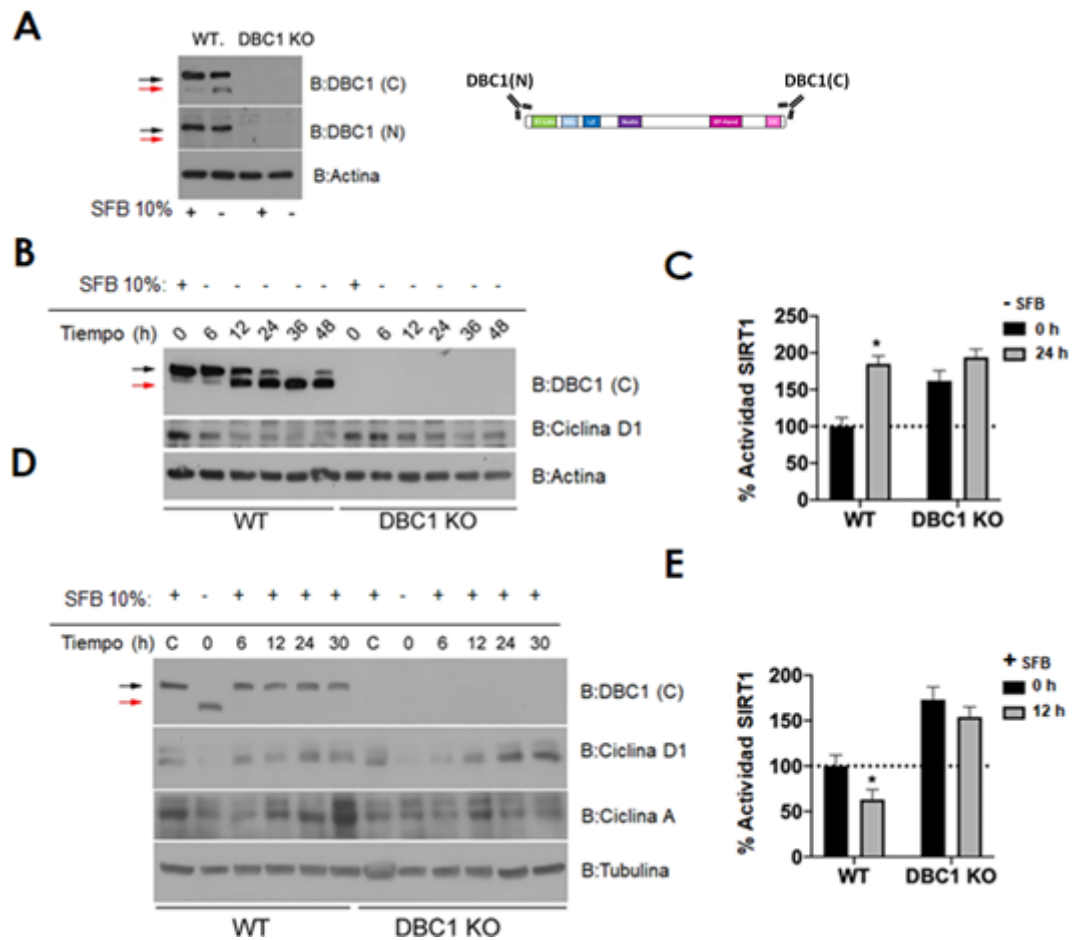


Figura 4.1 Células MEFs quiescentes expresan DN-DBC1 a expensas de la desaparición de DBC1 A) A la izquierda, Western blots de lisados de MEFs WT y *Dbc1* KO crecidas durante 48 h en medios con y sin 10% SFB. Aquí se pueden ver los resultados obtenidos utilizando un anticuerpo que reconoce el extremo amino (1-50 aa) y otro que reconoce el extremo carboxilo (825-875 aa) de DBC1. Las flechas negra y roja indican la forma DBC1 y DN-DBC1 respectivamente. A la derecha un esquema de de las regiones a las que se unen los anticuerpos utilizados B) Western blots de MEF crecidas en ausencia de SFB durante distintos tiempos C) Medidas de actividad SIRT1 en lisados de MEFs crecidas en medio de cultivo libre de SFB D) Western blots de lisados de células MEFs WT y *Dbc1* KO crecidas en medio con SFB 10% (control), crecidas durante 48h en medio sin suero (t = 0) y crecidas durante 48h sin SFB y luego se les reemplazó el medio por medio con SFB E) medida de actividad SIRT1 en células MEFs quiescentes y en células que volvieron a proliferar luego del arresto celular. * media $p < 0.05$ comparado con el control (t0) para cada genotipo, prueba de t Student no pareado.

DBC1 es modificada postraduccionalmente por un mecanismo dependiente del proteosoma

Luego que determinamos que DN-DBC1 se expresa en células quiescentes, nos propusimos estudiar cómo se origina. La nueva forma de DBC1 podría producirse a nivel transcripcional, por splicing alternativo, generando una nueva isoforma de DBC1. Otra posibilidad es que DN-DBC1 sea producto de la modificación postraduccional de DBC1, lo que implicaría la eliminación de un segmento de DBC1 en su extremo amino terminal.

Exploramos entonces en primer lugar la posibilidad de que DN-DBC1 fuera una isoforma de DBC1. Realizamos un análisis bioinformático con los datos de transcriptómica disponibles de tejido hepático de ratón y humano. En la búsqueda de posibles productos de splicing alternativo para DBC1 no observamos ninguno que codifique una proteína que se corresponda con el peso molecular aproximado observado para la DN-DBC1 (Fig. 4.2 A,B). De este análisis concluimos que DN-DBC1 no sería una isoforma de DBC1.

Para confirmar nuestros resultados de transcriptómica, transfectamos células MEF *Dbc1* KO con un plásmido de expresión de DBC1 (Fig.4.2C). El plásmido de expresión solo cuenta con la secuencia codificante para la proteína, por lo el transcripto no es posible de sufrir *splicing*. En este experimento también observamos la expresión de DN-DBC1 a expensas de la desaparición de DBC1, en células quiescentes. Este resultado confirma los resultados del análisis transcriptómico e indican que DN-DBC1 no es sintetizada *de novo*.

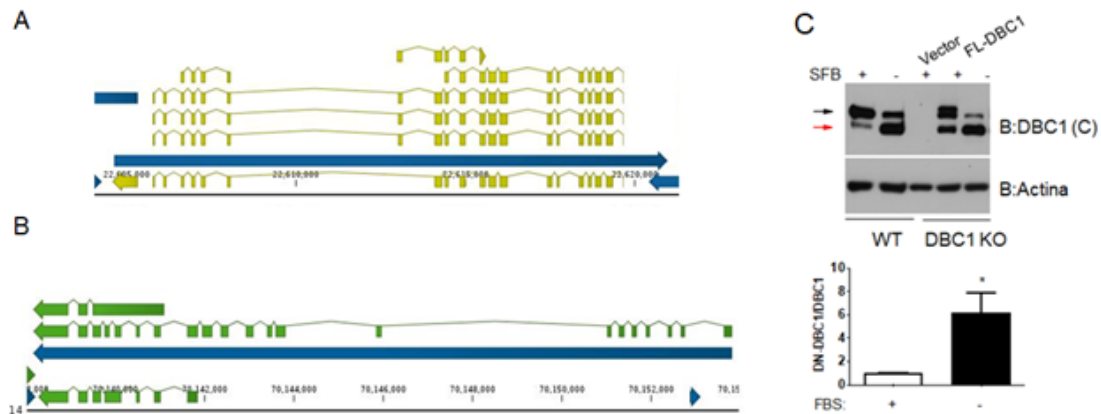


Figura 4.2 Análisis de datos de transcriptómica de de las posibles variantes de splicing del ARNm de DBC1 A) Análisis bioinformático de posibles variantes de *splicing* del ARNm maduro codificante para DBC1 según datos de transcriptómica de hígado de ratón B) Análisis bioinformático de posibles variantes de *splicing* del ARNm maduro codificante para DBC1 según datos de transcriptómica de hígado humano C) western blot de lisados de células MEF WT/*Dbc1* KO que expresan transitoriamente Flag-DBC1 recombinante y que fueron sometidas a 48 horas de privación SFB. También se presenta la cuantificación por densitometría de tres experimentos independientes. N=3 por condición * media $p < 0.05$ t-test

Por otra parte, encontramos que si tratábamos células de ratón y humanas, con MG132, un compuesto inhibidor del proteasoma, los niveles de DN-DBC1 disminuían en las células crecidas en ausencia de SFB (Fig 4.3A). También realizamos tratamiento con cicloheximida, un compuesto inhibidor de la síntesis proteica. Este tratamiento evitaría la aparición de DN-DBC1 si está fuera sintetizada *de novo*. En estos experimentos vimos que la cicloheximida no interfiere en la aparición de la DN-DBC1 (Fig 4.3). En conjunto estos resultados

indican que DN-DBC1 es producida a expensas de la proteólisis de DBC1, y esto sucede tanto en células humanas como de ratón.

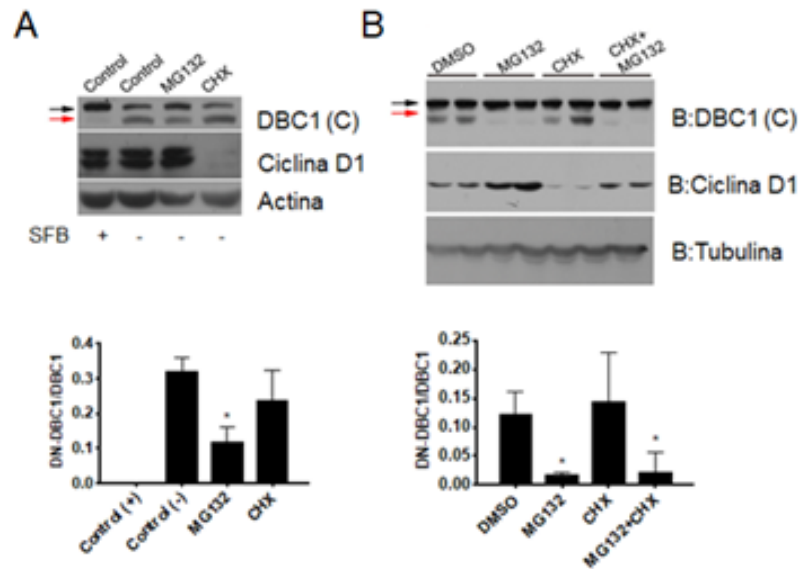


Figura 4.3 DN-DBC1 aparece a expensas del procesamiento de de DBC1 A,B) westerns blots para lisados células MEFs WT (A) y la línea celular humana IMR90 (B). Ambos cultivos fueron incubados en ausencia de SFB durante 48 h y fueron tratadas luego con MG132 10 μ M y CHX 100 μ g/ml durante 6 horas. Se muestran resultados de western representativos y de cuantificación por densitometría de las bandas de tres experimentos independientes. N=3 para cada condición *media $p < 0,05$ ANOVA de una vía.

DN-DBC1 no cuenta con sus primeros cien aminoácidos

En el paso siguiente nos propusimos determinar cuál es el sitio de corte de DBC1. Para ello obtuvimos extractos enriquecidos en DBC1 y DN-DBC1 (inmunoprecipitados de lisados de hígado) y los analizamos por espectrometría de masas. Obtuvimos una cobertura del 28-29% de la secuencia de DBC1 para las dos formas. Ambas fueron identificadas como DBC1 de manera estadísticamente significativa. Analizamos luego que parte de la secuencia de proteína está ausente en DN-DBC1. Para DBC1 se detectaron tres péptidos que no estaban presentes en la muestra de DN-DBC1. Este análisis nos permitió

determinar el entorno donde ocurre el corte, encontrando que la proteína DN-DBC1 carece de los primeros 124 a 138 aminoácidos de la secuencia amino-terminal (Fig. 4.4). Esto implica que DN-DBC1 carece del dominio S1-like de unión a ácidos nucleicos pero mantiene su señal de localización nuclear y el dominio cierre de leucinas (Fig. 4.4B). Observamos que las secuencias de las proteínas humana y la de ratón en el entorno de los 124-138 aa son idénticas en ambas especies. De esto podemos inferir que la proteína humana posiblemente comparta el sitio de corte con la proteína de ratón.

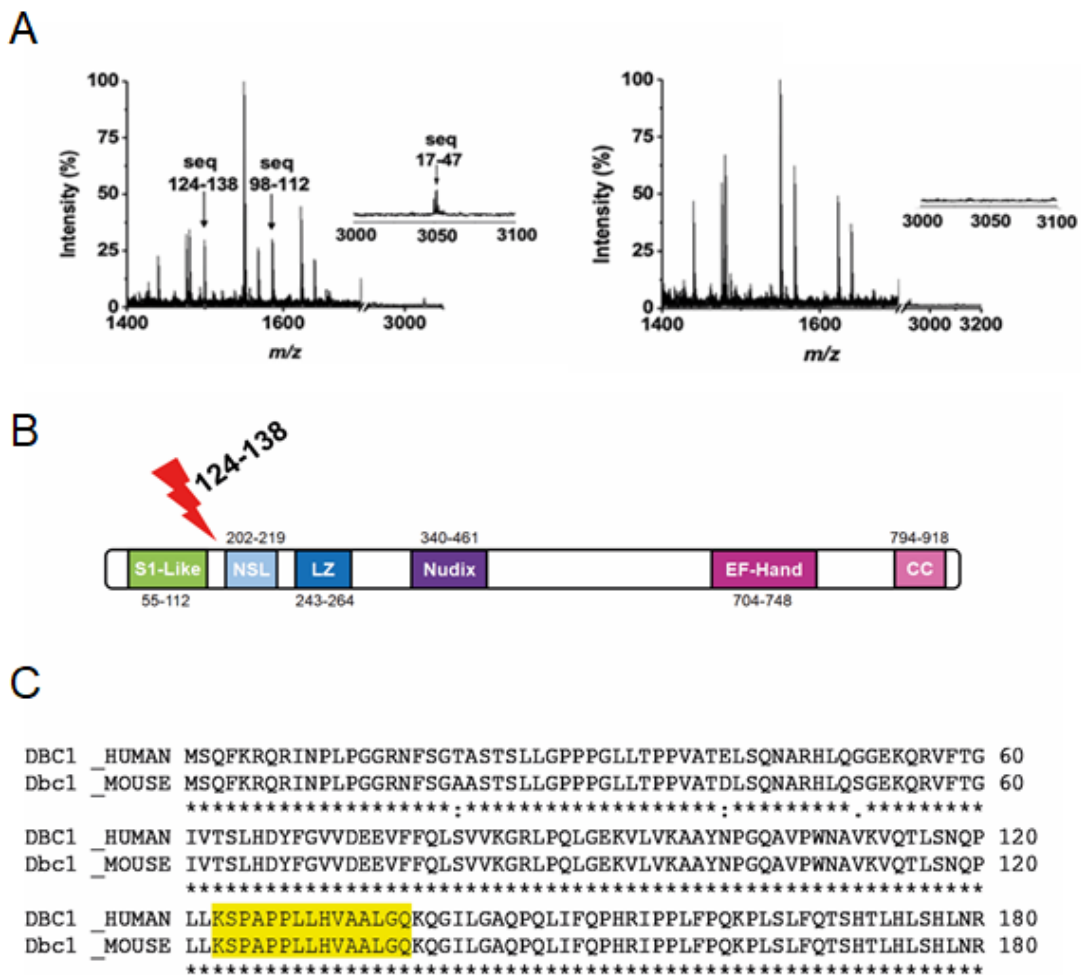


Figura 4.4 DN-DBC1 es producto de la pérdida de los primeros 124-138 aminoácidos de DBC1 A) Se observan los espectros de masa de tres péptidos presentes en DBC1 y ausentes en DN-DBC1 B) del resultado presentado en A se infiere que el corte se da en el entorno de

los residuos 124-138. C) Se presentan alineadas las secuencias de la DBC1 humana y la de ratón y se señala que en la región del corte la secuencia es la misma para las dos especies.

La sustitución de los residuos de lisina 93, 112, 123 y 138 por residuos de arginina no es suficiente para evitar el corte de la proteína

Nuestros datos apuntan que el proteosoma está involucrado en el procesamiento de DBC1. Aún así no podemos descartar que el corte pueda estar siendo catalizado por otras proteasas. Analizamos qué modificaciones postraduccionales estaban reportadas para DBC1 en el entorno del sitio de corte que pudieran regular la aparición de la forma trunca. Las modificaciones postraduccionales reportadas para DBC1 humana se presentan de manera esquemática en la figura 4.5 A. El esquema, generado en el sitio phosphosite.org, muestra las ubiquitinaciones, fosforilaciones, acetilaciones y metilaciones que se han reportado para DBC1 humana, y que han sido presentadas al menos cinco veces en revistas arbitradas. Como se muestra más arriba, nuestros resultados *in-vitro* con el MG132 evidencian que el sistema ubiquitín-proteosoma participa en el procesamiento de DBC1. Esto nos hizo pensar en la ubiquitinación de lisinas como posible modificación postraduccionales para dirigir el corte de la proteína. Cabe recordar que la ubiquitinación de lisinas es la marcación molecular que dirige a las proteínas hacia su procesamiento proteosomal. Hicimos foco en las lisinas K93, K112, K123 y K138 que se localizan en el entorno de donde ocurre el corte de DBC1. Así fue que generamos, por mutagénesis dirigida, plásmidos para inducir la expresión de distintos mutantes de DBC1. Generamos los mutantes K93R, el tri mutante K93R-K112R-K123R y un tetra mutante con las cuatro lisinas sustituidas por residuos de arginina. En todos los casos, corroboramos las construcciones mediante secuenciación. Transfectamos células MEF *Dbc1* KO con nuestras construcciones y evaluamos la capacidad de las células en

quiescencia de producir DN-DBC1 a partir de la proteína recombinante. En ninguno de los casos observamos la desaparición de DN-DBC1. En la figura 4.7B se muestra el resultado del experimento utilizando al tetra mutante, en donde constatamos como el corte sigue ocurriendo. Esto nos llevó a la conclusión de que las lisinas en el entorno del sitio de corte no son requeridas para el reconocimiento del proteasoma y la producción de DN-DBC1.

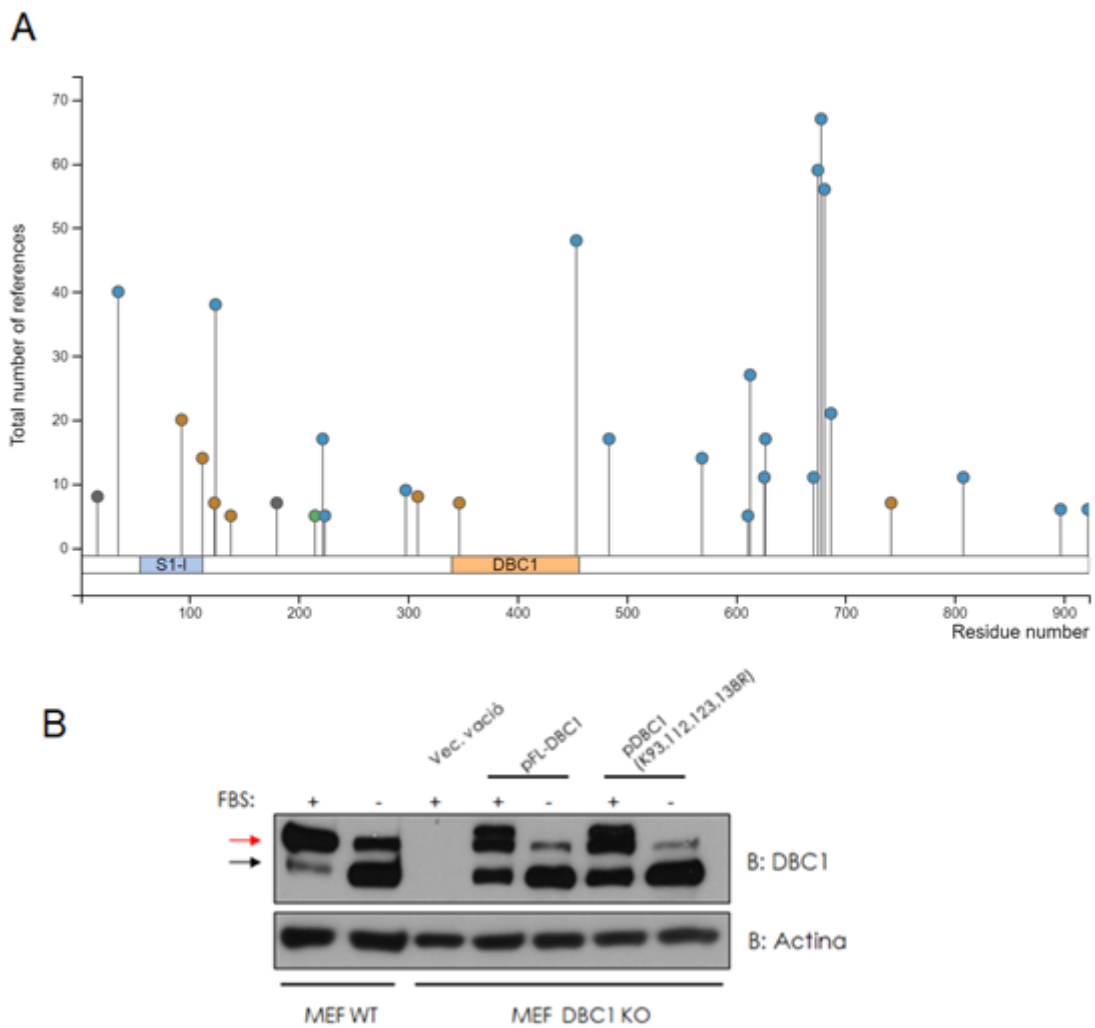


Figura 4.5 Mutación de lisinas ubiquitinables para intentar suprimir el corte de DBC1 A) se muestra un esquema donde se presentan las modificaciones postraduccionales reportadas para DBC1 al menos cinco veces. En naranja se muestran las ubiquitinaciones, en celeste las fosforilaciones, en verde acetilaciones y en violeta metilaciones B) Western blot de células MEF

transfectadas con DBC1 mutada en sus lisinas K93,112,123,138 para evaluar su rol en el procesamiento de la proteína

DN-DBC1 pierde su capacidad de inhibir la actividad de SIRT1

Habiendo mapeado el sitio aproximado de corte diseñamos y generamos vectores de expresión para DN-DBC1, donde eliminamos los primeros 138 residuos de la proteína humana (Δ N138 DBC1), partiendo de un vector de expresión de DBC1. Luego de confirmar la identidad del mutante mediante secuenciación, verificamos que los vectores funcionaran correctamente para la expresión transitoria en células comprobando que ambas proteínas recombinantes se expresan en el núcleo (Fig. 4.6A). A continuación medimos la actividad SIRT1 en células transfectadas con las distintas formas de DBC1. Evaluamos la actividad SIRT1 de dos formas: utilizando un método *in-vitro* con un sustrato artificial, y por western blot detectando los niveles de acetilación de histona H3 (un sustrato natural de SIRT1; AcH3K9)¹⁰⁴. Observamos que la actividad enzimática de SIRT1 disminuye de forma estadísticamente significativa con respecto al control cuando sobre expresamos a DBC1. En cambio la sobre-expresión de DN-DBC1 no tuvo un efecto sobre la actividad de SIRT1 medida *in-vitro* (Fig.4.6B). Por otro lado, medimos la actividad SIRT1 *in-situ* evaluando los niveles de AcH3K9 (Histona H3 acetilada en la lisina 9), sustrato endógeno de la proteína¹⁰⁵. No vimos un efecto claro en los niveles de AcH3K9 cuando expresamos solamente las diferentes formas de DBC1. Entonces decimos sobre-expresar también a SIRT1 para ver un efecto más claro. Co-expresamos a las formas DBC1 y DN-DBC1 con SIRT1: la sobre-expresión de SIRT1 resultó en una menor acetilación de H3K9 respecto al control (figura 4.6 C). Esta disminución en la acetilación es revertida al co-transfectar DBC1. En cambio, cuando co-expresamos DN-DBC1 y SIRT1 no vimos cambios en la

acetilación de AcH3K9 en comparación con las células que sólo sobre-expresan SIRT1 (Fig. 4.6C). Estos resultados muestran que DN-DBC1 no es capaz de inhibir la actividad desacetilasa de SIRT1.

En vista de los resultados obtenidos sobre la actividad de SIRT1, evaluamos si DN-DBC1 mantiene su capacidad de interactuar con la desacetilasa. Para esto realizamos experimentos de coimmunoprecipitación en células HEK293 transfectadas con los vectores de expresión de cada una de las formas de DBC1. En la figura 4.6D presentamos el resultado de dicho experimento donde observamos que la DN-DBC1 no co-sedimenta con SIRT1, lo que refleja una pérdida en su capacidad de unión. Este dato es interesante teniendo en cuenta que DN-DBC1 aún cuenta con el dominio cierre de leucinas que ha sido reportado como sitio de unión a SIRT1¹²

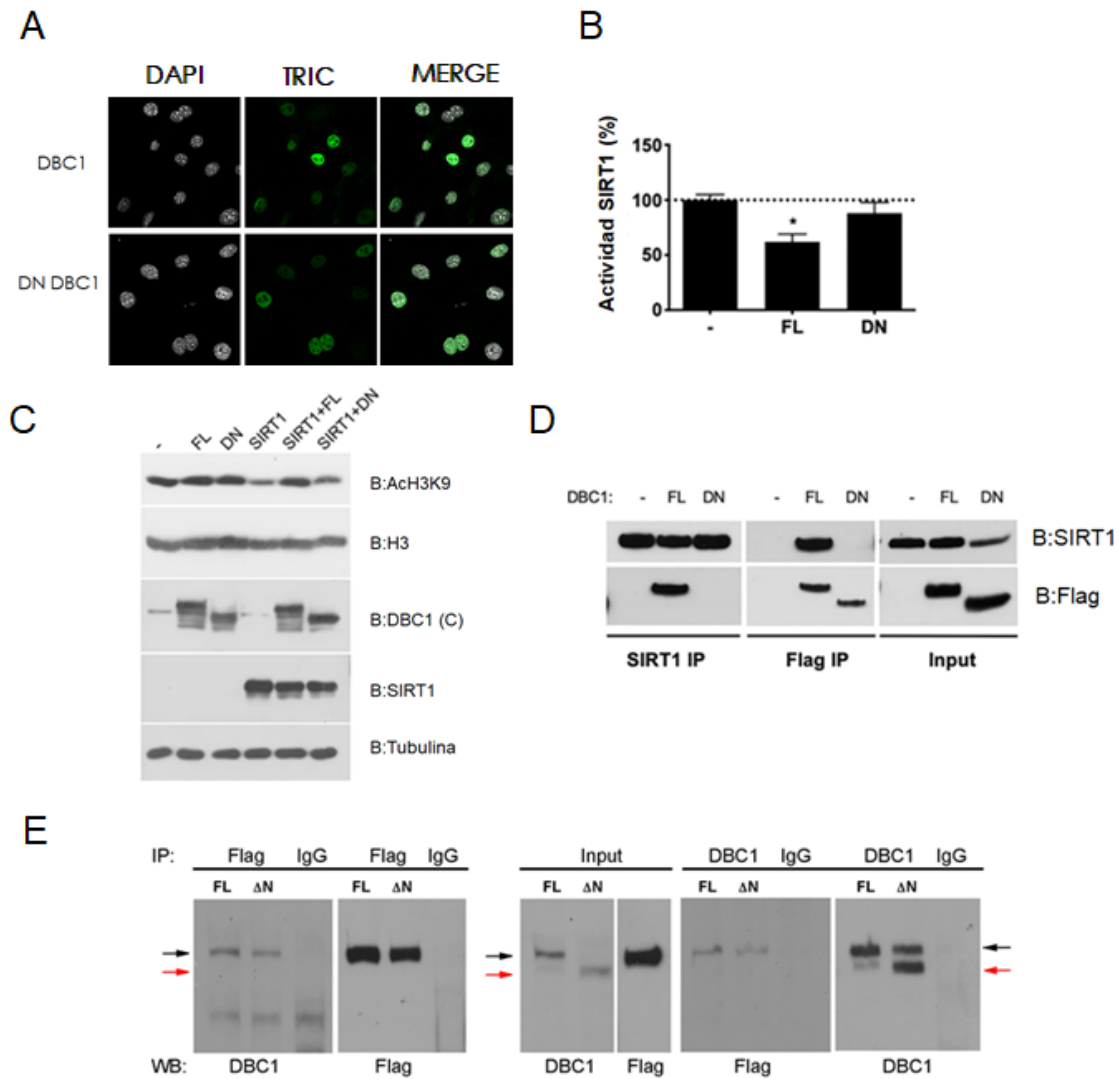


Figura 4.6 DN-DBC1 no interacciona con SIRT1 A) Se muestra imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencia. Se observa la localización nuclear de las proteínas DBC1 y DN-DBC1 expresadas de manera transitoria. B) Medidas *in-vitro* de actividad SIRT1 en células en extractos celulares de células HEK293 transfectadas transitoriamente con plásmidos de expresión para DBC1 y DN-DBC1. La actividad se expresó como un porcentaje de actividad respecto al control (-) de tres experimentos independientes. ANOVA de una vía. C) Western blots de células HEK293 transfectadas de manera transitoria con plásmidos de expresión de las proteínas DBC1, DN-DBC1 y SIRT1. D) Western blots de experimentos de coimmunoprecipitación en extractos de células HEK293 transfectadas con plásmidos de expresión DBC1 y DN-DBC1 E) Western blots de experimentos de coimmunoprecipitación de las distintas formas de las variantes de DBC1 en lisados de hígado utilizando como carnada a la proteína SIRT1 recombinante.

Para confirmar si la DN-DBC1 producida endógenamente efectivamente pierde la capacidad de unir SIRT1, realizamos experimentos de *pull-down* en lisados de tejido hepático. La estrategia utilizada fue producir y purificar FLAG-SIRT1 recombinante, para luego usarla como carnada en los lisados de tejido hepático (Fig. 4.6E). El resultado fue similar al que obtuvimos con las proteínas recombinantes en el experimento *in vitro*. Observamos la interacción de FLAG-SIRT1 solo con la forma DBC1 completa y no con su forma truncada. En suma, estos resultados demuestran que DN-DBC1 no se une a SIRT1.

DBC1 y DN-DBC1 tienen la capacidad de formar multímeros

Como mencionamos antes, varios de los interactores de DBC1 compiten por la unión a la proteína. Algunos, como es el caso de p53 y SIRT1, no sólo interaccionan con DBC1 sino que a su vez son sustrato una del otra^{13,66}. Por otra parte, varios de sus blancos son proteínas que catalizan la adición y remoción de modificaciones epigenéticas^{11,12,18}. Estas características ya conocidas de la proteína sugieren que DBC1 puede actuar reclutando distintos juegos de interactores, coordinando así sus funciones. En ese sentido, la formación de multímeros de DBC1 podría ser una forma de congregarse a las diferentes proteínas. Hace algunos años, surgió un reporte donde se muestra que DBC1 es capaz de oligomerizar³¹. Para confirmar esto y evaluar si DN-DBC1 también posee esa capacidad, sobre-expresamos las distintas formas de DBC1 en células HEK293T por separado y en simultáneo. Como forma de evaluar su interacción utilizamos el método de fijación y crosslinking con glutaraldehído. Este compuesto genera uniones covalentes entre subunidades de proteínas que interaccionan formando multímeros¹⁰⁶. De haber interacción, con esta técnica se

espera ver un aumento en el peso molecular al detectar la proteína en un western blot. En la figura 4.7A observamos la aparición de bandas discretas a un mayor peso molecular que el esperado para DBC1. Estos resultados nos dieron un indicio de que tanto DBC1 como DN-DBC1 tienen la capacidad de interaccionar en forma de complejos multiproteicos. Por lo tanto, la nueva forma de DBC1 conserva la capacidad de formar complejos, lo que no sabemos es cuáles son las moléculas que conforman estos complejos. Lo que resulta interesante, es que para el caso de la DN-DBC1 observamos una menor presencia de la forma monomérica de la proteína en comparación a lo que se ve cuando expresamos al mismo tiempo DN-DBC1 y DBC1 o cuando expresamos solo a DBC1. En esos dos casos vimos que las proteínas se presentan principalmente formando complejos (Fig.4.7A). Esto podría indicar que el tipo de complejo que se forma con una u otra proteína es diferente.

Los experimentos de *cross linking* con glutaraldehído no son suficientes para determinar si DN-DBC1 y DBC1 son capaces de interaccionar directamente entre ellas. Con la finalidad de estudiar esto último, utilizamos plásmidos de expresión de las dos formas (DBC1 y DN-DBC1) que cuentan con epítopes FLAG y un plásmido de expresión de DBC1 con epítope HA. Esto nos permitió inmunoprecipitar con uno de los *tags* y detectar si había una co-inmunoprecipitación de la otra proteína recombinante, detectando el otro tag por western blot. De esta manera determinamos que probablemente DBC1 forma complejos consigo misma y con DN-DBC1, como se muestra en la figura 4.7 B. Aún así no podemos concluir si DBC1 forma un complejo multimérico compuesto exclusivamente por esta proteína, o si hay otros componentes que sirven de puente aglutinando varias subunidades de DBC1. En cualquiera de los dos casos lo que sí es seguro, es que en los complejos formados por DBC1, la DN-DBC1 sigue estando presente pero en menor cantidad (Figura 4.7). Por lo

tanto, si bien DN-DBC1 se incorpora en un complejo supramolecular de DBC1, DBC1/DBC1 tendría una mayor afinidad que DBC1/DN-DBC1.

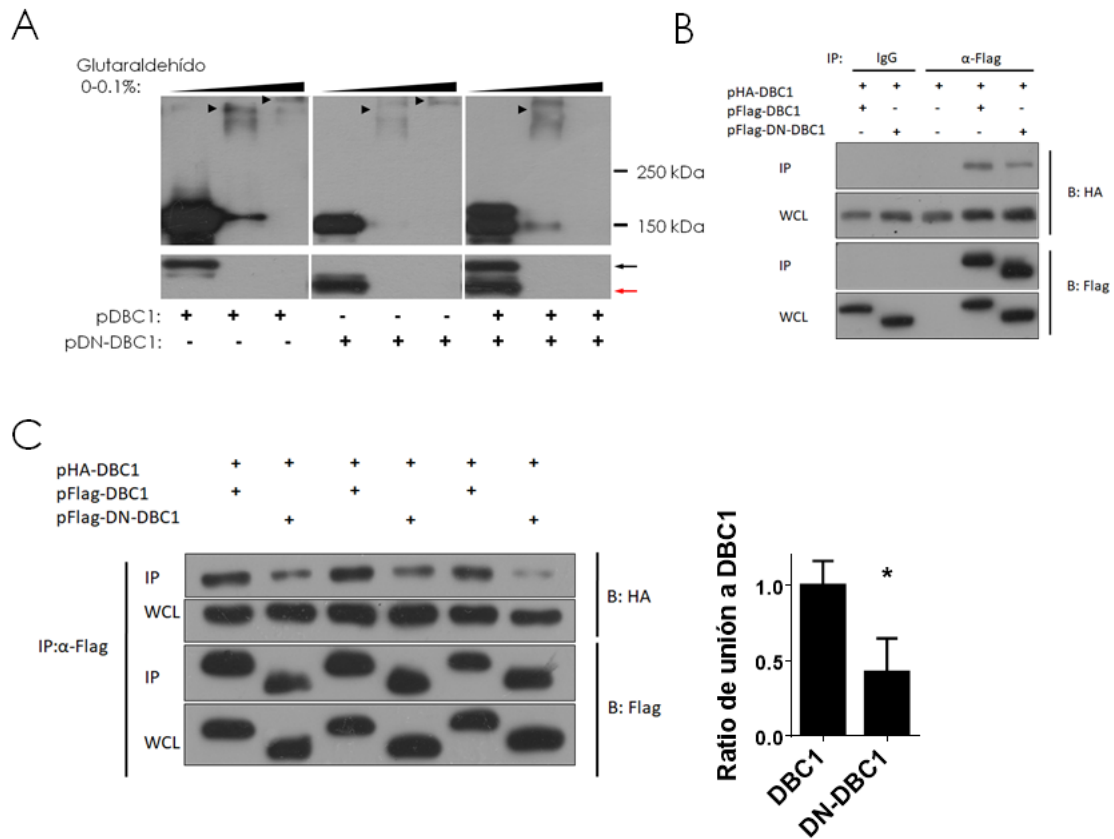


Figura 4.7 Oligomerización de DBC1 y DN-DBC1 A) Western Blots de lisados celulares de HEK293T transfectadas con las diferentes formas de DBC1. Las células recién cosechadas fueron fijadas con 0,05 % y 0,1% de glutaraldehído. B) WB de puesta a punto de co-inmunoprecipitaciones de DBC1 y DN-DBC1 C) Cuantificación de la unión entre DBC1 y DN-DBC1 en experimentos de *pull down*. * $p < 0,05$ t-test.

Los niveles de DBC1 y DN-DBC1 son regulados también in-vivo

Habiendo determinado que la proteína DN-DBC1 se expresa principalmente en células quiescentes, desapareciendo cuando estas células re-ingresan al ciclo,

nos preguntamos si este fenómeno podría estar sucediendo *in-vivo*. Para esto estudiamos la expresión de DN-DBC1 en el hígado durante el proceso de regeneración hepática, tras un procedimiento de hepatectomía parcial. Las características fisiológicas del proceso de regeneración hepática hacen que sea un modelo ideal para monitorear variaciones en los niveles de DBC1/DN-DBC1 y su relación con ciclo celular *in-vivo*. El hígado cuenta con una gran capacidad regenerativa. Este órgano está formado mayoritariamente por hepatocitos, que se encuentran arrestados en G₀. El daño producido al remover quirúrgicamente parte del hígado, induce que los hepatocitos presentes en el tejido remanente reingresen de manera sincrónica a G₁, y retomen el ciclo proliferativo. La hiperplasia producida en el tejido hepático culmina con la recuperación de la masa hepática original, y los nuevos hepatocitos vuelven de nuevo a su estado de quiescencia. Otra ventaja de la utilización del modelo es que nos permitió estudiar los niveles de DBC1/DN-DBC1 en un tejido donde se ha demostrado el importante rol que juega DBC1^{23,34}.

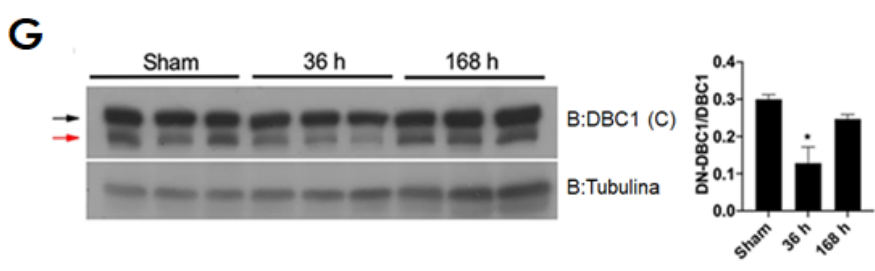
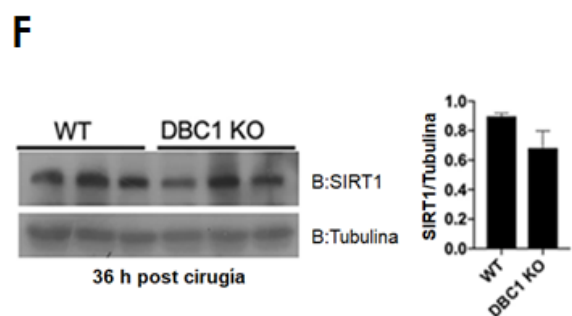
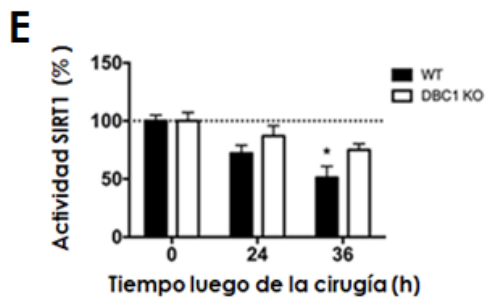
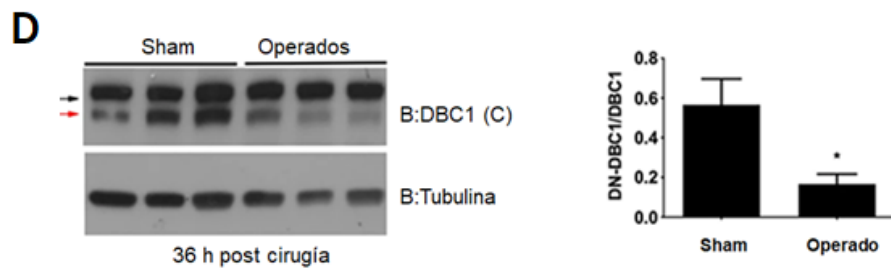
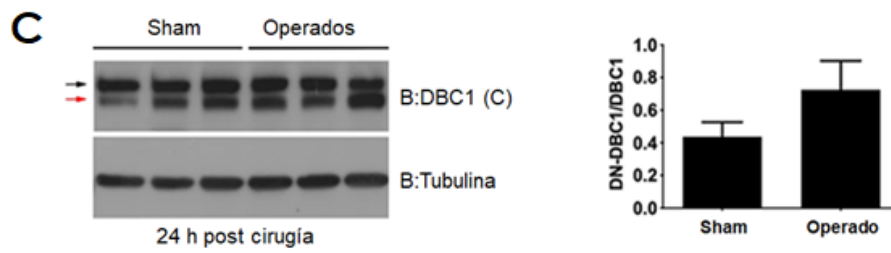
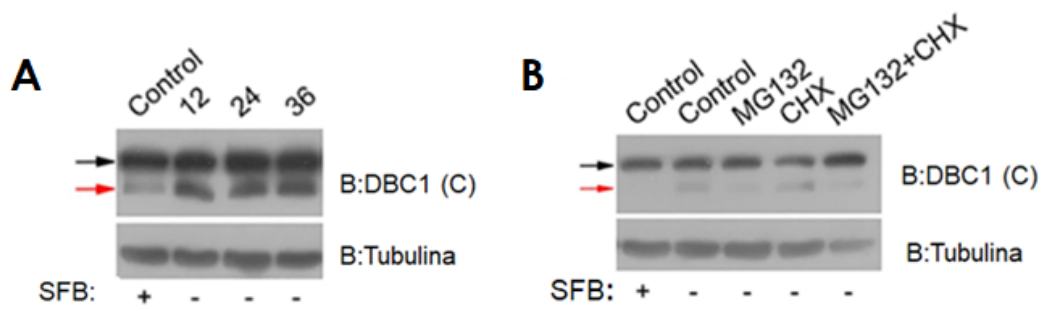


Figura 4.8 La relación DBC1/DN-DBC1 es regulada dinámicamente según el estado proliferativo de la célula *in-vivo* e *in-vitro* acompañando de cambios en la actividad SIRT1

A) WB de lisados de células HepG2 incubadas en medio libre de SFB durante 12, 24 y 36 h B) WB de lisados de células HepG2 crecidas en presencia o ausencia de SFB y tratadas con MG132, con cicloheximida o con las dos en simultáneo, durante 6 h.C) WB de lisados de hígados de ratones sham y sacrificados a las 24h de ser hepatectomizados. Junto al resultado del blot se enseñan las cuantificaciones de DN-DBC1/DBC1 por densitometría de los WB. t-Test. D) WB de los lisados de hígados de ratones sacrificados 36 h luego de ser hepatectomizados junto a su densitometría correspondiente. Test de t E) Medidas de actividad SIRT1 en lisados de hígado de animales WT y *Dbc1* KO a distintos tiempos luego de haber sido hepatectomizados. 3 animales por condición, ANOVA de dos vías F) Niveles de SIRT1 en los hígados de animales WT y *Dbc1* KO 36h luego de la hepatectomía cuantificados por WB. ANOVA de dos vías G) WB de lisados de hígado de animales WT hepatectomizados y sacrificados a las 36h y 168h luego de la hepatectomía. 3 animales por condición ANOVA de dos vías.

Antes de comenzar con las cirugías verificamos que DN-DBC1 se expresa en una línea celular hepática como son las células derivadas de hepatocarcinoma humano HepG2. Al igual que en MEFs, DN-DBC1 aumenta su expresión al inducir el arresto celular por deprivación de SFB (Fig. 4.8A). Por otra parte, volvimos a constatar que la inhibición del proteasoma con MG132 inhibe la aparición de DN-DBC1 (Fig. 4.8B).

Realizamos hepatectomías parciales removiendo 2/3 del hígado de ratones WT y *Dbc1* KO y seguimos por WB la expresión de DBC1 y DN-DBC1. Encontramos que a las 24 horas luego de la cirugía DN-DBC1 se expresa en el tejido de los animales hepatectomizados al mismo nivel que en los animales control (*sham*).

También observamos que a medida que pasó el tiempo post hepatectomía, la proteína DN-DBC1 disminuyó significativamente en comparación con el control, expresándose al mínimo a las 36 horas post hepatectomía. A su vez estudiamos la relación entre los niveles de expresión de las dos formas de DBC1 y la actividad de SIRT1 durante la regeneración hepática. Para ello, medimos la actividad de SIRT1 en lisados de hígados de animales WT y *Dbc1* KO a distintos tiempos luego de la cirugía. Encontramos que la actividad de SIRT1 disminuyó significativamente con respecto a la actividad en hígados sham y a la actividad de SIRT1 en hígados de animales *Dbc1* KO (Fig. 4.8E). Como se aprecia en la Figura 4.8F, la expresión de SIRT1 no fue diferente en los hígados de animales WT y KO a las 36h de la cirugía. En la figura 4.8G se observa cómo una vez concluido el proceso de regeneración los niveles de DN-DBC1/DBC1 se igualaron con los niveles en el hígado de los animales no operados. En suma, los resultados de la actividad SIRT1 y la expresión de DN-DBC1/DBC1 en los hígados post hepatectomía, sugieren que la regulación de la actividad SIRT1 es mediada por la modificación postraducciona1 de DBC1.

La ausencia de DBC1 genera alteraciones en la regeneración del hígado

Nuestros datos demuestran que existe una regulación de DN-DBC1/DBC1 y de la actividad SIRT1 durante el proceso de regeneración en el hígado. Fuimos a explorar entonces que sucede en animales *Dbc1* KO durante las primeras 72 horas luego de la cirugía. No encontramos diferencias en el análisis histológico de hígados entre los animales WT y *Dbc1* KO. Sin embargo, al analizar los tejidos 72 horas después de la hepatectomía parcial sí observamos diferencias entre genotipos. El tejido de los WT fue comparable al de los animales *sham* WT. Sin embargo, el tejido de los KO hepatectomizados presentó una organización menos estructurada del lóbulo hepático donde no se observaron los sinusoides alrededor de la vena central (Fig. 4.9). También estudiamos los niveles de las

enzimas transaminasas hepáticas, la aspartato aminotransferasa y la alanina aminotransferasa. Las medidas de actividad de estas enzimas son un marcador utilizado para evidenciar el daño hepático producido en la cirugía^{107,108}.

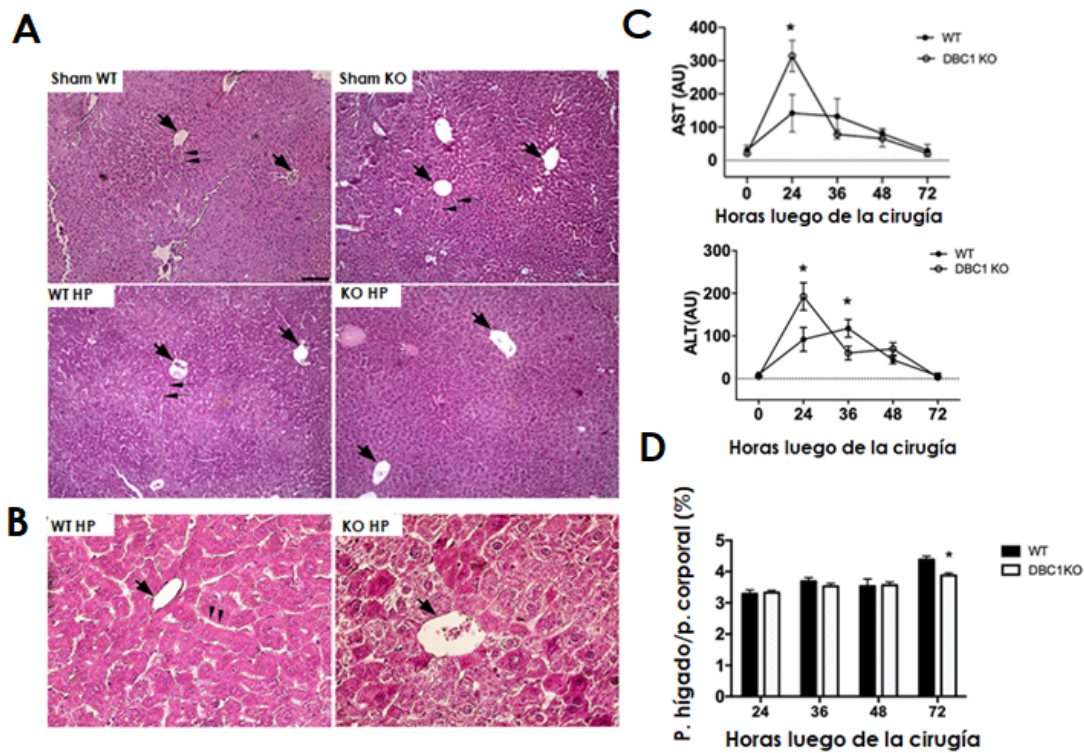


Figura 4.9 Los ratones DBC1 KO presentan alterado el proceso de regeneración hepática A,B) Tinciones con hematoxilina y eosina de cortes histológicos de hígados de animales WT y KO *sham* o regenerando luego de las hepatectomía (HP) Se señala con flecha gruesa la vena central y los sinusoides con flechas finas C) Medidas de transaminasas hepáticas en sangre luego de la cirugía 3 animales para cada tiempo, ANOVA de dos vías D) Curso temporal de la recuperación de la masa hepática luego de las cirugías. La masa del hígado fue normalizada al peso total del animal. El peso total del hígado de animales WT y DBC1 KO no presenta diferencias significativas en los hígados *sham*. 5 animales WT y KO en cada tiempo, t-test para cada tiempo.

Observamos que a las 24 horas luego de la cirugía los niveles de ambas enzimas estaban significativamente más elevados en los animales KO con respecto a los WT (Fig. 4.9C). A partir de estos resultados podemos interpretar que los

animales DBC1 KO presentaron un retraso en resolver el daño que les generó la cirugía. Las diferencias en los niveles de transaminasas se perdieron luego de las 24 horas. Al seguir la recuperación de la masa hepática luego de la cirugía, observamos que los hígados del genotipo KO presentaron un retraso en la recuperación de su masa, lo que confirmó un retraso en el proceso regenerativo. Estos resultados indican que DBC1 es necesaria para que el proceso de regeneración hepática transcurra con normalidad.

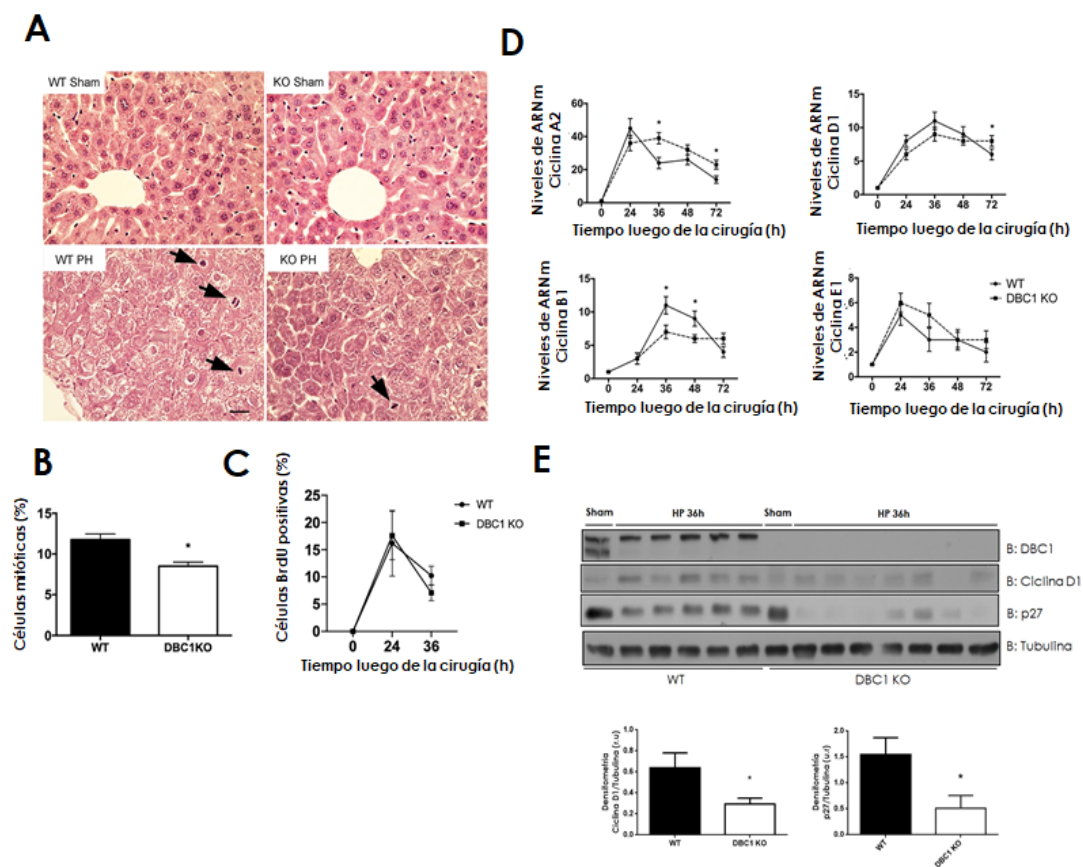


Figura 4.10 La ausencia de DBC1 afecta la progresión del ciclo celular *in vivo* A) Imágenes representativas de cortes histológicos teñidos con Hematoxilina y Eosina de hígados de animales sham y 36 horas luego de la hepatectomía. Las flechas negras indican células en mitosis B) Cuantificación del porcentaje de células en mitosis. 5 animales por condición test de t C) Cuantificación de incorporación de BrdU en hígados de ratones WT y *Dbc1* KO a distintos tiempos luego de la hepatectomía D) Niveles de expresión de distintas ciclinas

durante la progresión de la regeneración hepática cuantificados por PCR cuantitativa.*p<0.05 ANOVA de dos vías E) Niveles de ciclina D1 y p27 a las 36 horas luego de la cirugía cuantificadas por WB. 6 animales WT y 7 KO, *p<0,05 t-test.

Los animales DBC1 KO presentan alteraciones en la progresión de su ciclo celular durante la regeneración hepática

Prosiguiendo con el análisis del efecto de la ausencia de DBC1 *in vivo* en contexto de la regeneración hepática, estudiamos el transcurso del ciclo celular en el hígado de animales WT y KO. A las 36 horas luego de la cirugía observamos que en el tejido hepático de los animales *Dbc1* KO hay menos hepatocitos en su fase mitótica en comparación con el tejido de los animales WT en iguales condiciones (Fig. 4.10A,B). Estos resultados sugieren que DBC1 cumple un rol regulando la proliferación de hepatocitos.

En un intento de determinar de forma más precisa cuál fase del ciclo se estaba viendo alterada hicimos experimentos de incorporación de Bromodesoxiuridina (BrdU), un análogo del nucleósido Timidina. La incorporación de BrdU se da durante la replicación del ADN, y refleja la capacidad de las células de salir de G₀, transitar por G₁ e ingresar a fase S. Los resultados de la marcación no mostraron diferencias entre genotipos, sugiriendo que la ausencia de DBC1 no compromete el reingreso de los hepatocitos al ciclo celular ni la replicación de su genoma.

Analizamos la expresión de ciclinas y no encontramos diferencias en las primeras horas de la regeneración. Observamos un pico en la expresión de

todas las ciclinas analizadas a las 24 horas para ambos genotipos. Sin embargo, a medida que transcurrió la regeneración, observamos diferencias en el patrón de expresión de las distintas ciclinas, entre los animales WT y los KO. La expresión de ciclina A2 mostró diferencias significativas a las 36 horas después de la cirugía, siendo más alta en los ratones DBC1 KO y permaneciendo elevada hasta 72 horas después de la cirugía (Fig. 4,10D). Por otro lado, vimos una disminución en los niveles de ciclina D1 en los hígados WT a las 72 horas, tiempo en el que los hígados ya mostraban recuperación de su masa normal. Esto no sucedió en los ratones *Dbc1* KO donde los niveles de ARNm de la ciclina D1 no disminuyeron (Fig.4,10D). La ciclina B1, normalmente incrementada previo al ingreso de la célula en mitosis, alcanzó su punto máximo a las 36 horas después de la hepatectomía en ratones WT. En cambio, los ratones *Dbc1* KO no presentaron este incremento en la expresión de la ciclina B1 a las 36 horas. No hubo diferencias significativas en la expresión de ciclina E1 durante todo el transcurso de la regeneración (Fig. 4,10D). Estas diferencias en los niveles de expresión de ciclinas en nuestro modelo *in-vivo* demuestran que los animales *Dbc1* KO presentan alteraciones en la regulación del ciclo celular en hepatocitos.

Las diferencias entre WT y KO en los niveles de ciclina D1 y p27 también son evidentes a nivel de proteína como se revela por WB cuando analizamos los hígados de los animales 36 horas post hepatectomía. En consonancia con los resultados de ARNm, la ciclina D1 está disminuida significativamente en los hígados KO a las 36 horas. En tanto los niveles más bajos de p27 en los hígados KO, proteína marcadora de G⁰¹⁰⁹, también es un indicador de que existe un retraso en la regeneración, y que el tejido hepático de los animales WT comienza a restaurar antes los niveles de la proteína p27. En conjunto nuestros datos demuestran que los hígados de los animales KO inician el proceso de regeneración hepática a la par con los WT pero que en los primeros, la

progresión se ve enlentecida, generando un retraso en la recuperación de la masa hepática.

DN-DBC1 se expresa en ratones y en humanos

Encontramos que DN-DBC1 se expresa tanto en células en cultivo como en tejidos de ratón. Teniendo en cuenta que DBC1 cumple funciones de relevancia en tejido adiposo fuimos a analizar la expresión de DN-DBC1 en este tejido. Tuvimos acceso a muestras de tejido adiposo e hígado humano, donde también fuimos a buscar la presencia de DN-DBC1. Encontramos que DN-DBC1 se expresa *in vivo*, en hígado y en tejido adiposo de ratón y humano (Fig. 4.11). También observamos que dentro del tejido adiposo las distintas fracciones celulares expresan preferentemente una forma u otra de DBC1. Esto lo pudimos determinar cuando fraccionamos el tejido adiposo en su fracción estromal vascular y en adipocitos (Fig 4.10). También vimos que había diferencias en la expresión de DN-DBC1/DBC1 entre las fracciones estromales vasculares de ratón y de humano. Los ratones parecen expresar principalmente a DN-DBC1 en su fracción estromal vascular, en tanto que en las muestras humanas la fracción estromal vascular presentó principalmente DBC1 (Fig. 4.11C,D). En definitiva, DN-DBC1 se expresa en tejido adiposo e hígado de ratón y humano. Dentro del tejido adiposo los distintos tipos celulares expresan distintos niveles de DN-DBC1/DBC1, habiendo diferencias en la expresión entre especies.

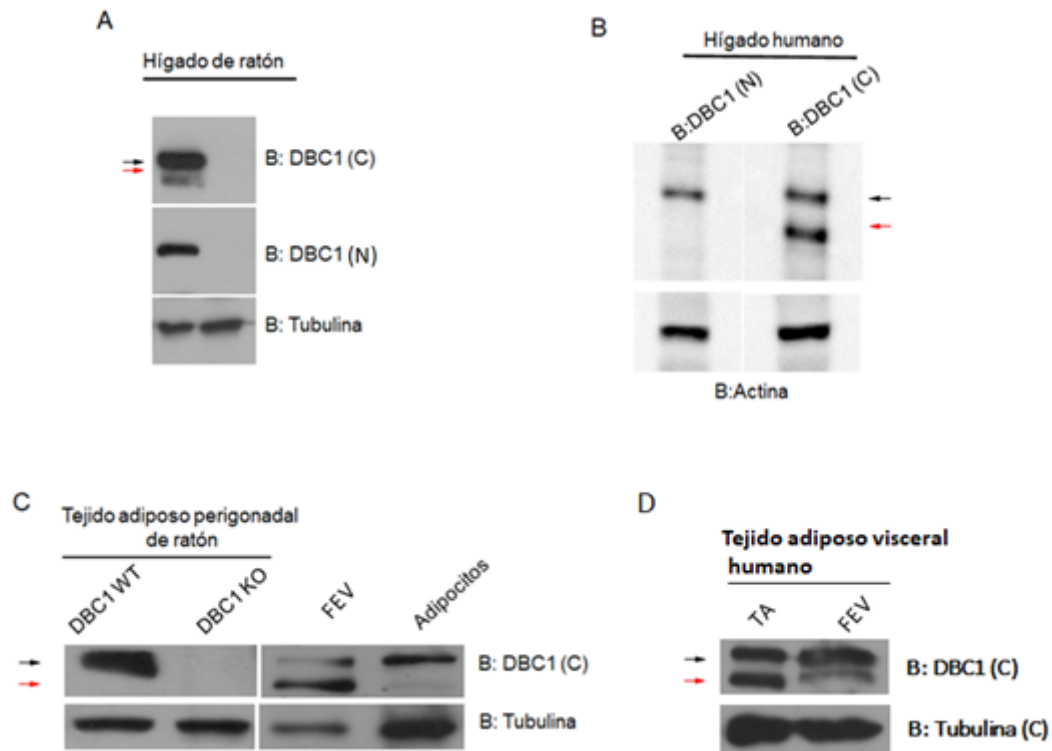


Figura 4.11 Western blot en homogenados de tejidos de ratón y humano A) Western blots de lisados de hígado de ratones WT y *Dbc1* KO B) Western blots de lisados de hígado humano C) Lisados de tejido adiposo blanco perigonadal de ratones WT y KO y fracciones estromales vasculares y adipocitos. D) Tejido adiposo visceral humano y fracción estromal vascular del mismo tejidos. En todos los casos se realizaron los blots con los anticuerpos para el extremo amino terminal y carboxilo terminal (DBC1(N) y DBC1(C))

4.2 Discusión

En nuestro trabajo encontramos que DBC1 es procesada proteolíticamente para dar una nueva forma de la proteína, a la cual denominamos como DN-DBC1. Esta versión de la proteína carece de su dominio amino terminal. Logramos aproximarnos a definir el sitio de corte, estableciendo que DN-DBC1 no cuenta con los primeros 124 a 138 aminoácidos de la secuencia de DBC1. Es así que DN-DBC1 conserva su señal de localización nuclear, permitiendo su ingreso al núcleo, pero pierde la capacidad de interactuar con SIRT1, y muy probablemente con sus otros interactores de la región N terminal.

Por otra parte definimos que las formas DBC1 y DN-DBC1 son reguladas dinámicamente tanto *in-vivo* como *in-vitro*. Nuestros datos apuntan a que DN-DBC1 es la forma predominante cuando las células se encuentran quiescentes, y que una vez que la célula retoma la proliferación DN-DBC1 es reemplazada por la forma DBC1. DN-DBC1 pierde su capacidad de unir y por lo tanto inhibir la actividad de SIRT1. De acuerdo con esto, en células quiescentes la mayor prevalencia de DN-DBC1 se acompaña de una mayor actividad SIRT1. Cuando las células retoman el ciclo, DN-DBC1 es rápidamente reemplazada por DBC1 y la actividad desacetilasa de SIRT1 disminuye. Varios de los trabajos que estudian *stem cells*, células que se encuentran quiescentes, reportan la importancia de la actividad de SIRT1 en el mantenimiento de la quiescencia. La desacetilación de PGC-1 α , FOXO y H4K16 mediada por SIRT1 reprime la activación de genes que promueven la salida de G₀¹¹⁰. En este contexto, la disminución de DBC1 que detectamos durante la quiescencia podría estar contribuyendo a mantener los niveles de actividad de SIRT1 para conservar el arresto celular.

Debemos tener en cuenta que DN-DBC1 no cuenta con el sitio de unión propuesto para la mayoría de sus interactores, entre ellos proteínas vinculadas con la regulación del ciclo celular. Por lo tanto, el impacto que tiene el procesamiento de DBC1 durante la quiescencia puede tener implicancias que van más allá de la regulación de SIRT1. En este trabajo no exploramos la capacidad de DN-DBC1 para unir a otros interactores, y es este uno de los aspectos que nos interesa abordar en el futuro.

También encontramos que DN-DBC1 se produce a expensas del procesamiento proteolítico de DBC1 en un mecanismo dependiente de la actividad del proteasoma. No pudimos demostrar si es el proteosoma que degrada parcialmente a DBC1 o si su acción es indirecta. Existe la posibilidad de que el

proteosoma degrade a proteínas que le pongan freno a la proteólisis de DBC1. Por ejemplo, durante la progresión del ciclo el proteosoma degrada a las ciclinas lo que lleva a la inactivación de las quinasas ciclinas dependientes. Sin embargo, podemos pensar en un posible escenario donde el proteosoma sea el que esté degradando directamente el extremo amino terminal de DBC1 para generar DN-DBC1. Hoy sabemos que dentro del núcleo celular se encuentra una población de la maquinaria proteosomal que regula el recambio de distintas proteínas nucleares, regulando la expresión génica y eliminando proteínas aberrantes¹¹¹. En un artículo publicado recientemente, y posterior a la publicación de nuestro trabajo, se observa cómo la abundancia de la maquinaria proteosomal dentro del núcleo es dinámica y dependiente del estado proliferativo celular. La cantidad de proteosoma dentro del núcleo y especialmente el asociado a la cromatina se ve incrementada durante la quiescencia y disminuye en células proliferantes que están impedidas de mantener el arresto en G_0 ¹¹². La visión clásica del funcionamiento del proteosoma establece que las proteínas poliubiquitinadas son reconocidas por el proteosoma y degradadas por las peptidasas proteosomales a péptidos de entre dos y diez aminoácidos¹¹³. Sin embargo hay una serie de trabajos que muestran cómo el proteosoma puede mediar la proteólisis parcial de algunas proteínas, activando su función¹¹⁴⁻¹¹⁸. Esto da lugar a pensar que durante la quiescencia DN-DBC1 podría ser producida por la acción del proteosoma dentro del núcleo.

Con la intención de bloquear el corte de DBC1, mutamos cuatro de las lisinas ubicadas en el entorno del sitio de corte que se han reportado como ubiquitinadas. En estos experimentos encontramos que la proteína sigue cortándose luego de la sustitución de sus lisinas. En uno de los trabajos donde se describe la proteólisis limitada por el proteosoma, los autores determinaron que son varias las lisinas necesarias para dirigir al procesamiento proteolítico

parcial¹¹⁸. En nuestro caso restan dos lisinas más en el entorno de las que ya mutamos que podrían ser esenciales para producir el corte.

Hay algunos de los mecanismos de proteólisis proteosomal limitada propuestos, que proponen la formación de dímeros y la ubiquitinación de una de sus subunidades. Esto dirige al dímero a ser procesado por el proteosoma. El proteosoma inicia la degradación de la unidad ubiquitinada pero es interrumpida por la interferencia de la subunidad no ubiquitinada¹¹⁹. En nuestro trabajo encontramos que DBC1 tiene la capacidad de oligomerizar, por lo tanto podría ser susceptible al procesamiento parcial al ser ubiquitinada y procesada en forma de multímero por el proteosoma.

La capacidad que tienen DBC1 y DN-DBC1 de formar multímeros abre la posibilidad de que DBC1 funcione como una proteína de andamiaje que permita la aglomeración de distintos interactores de DBC1 orquestando su actividad coordinada. Nuestros resultados de coimmunoprecipitación sugieren que la interacción DBC1/DN-DBC1 no es tan fuerte como la interacción entre DBC1/DBC1. Cuando realizamos experimentos de *cross-linking* con glutaraldehído determinamos que probablemente DN-DBC1 sea capaz de interactuar consigo misma. Esto deja abierta la posibilidad de que pueda haber una preferencia en la interacción entre una forma y otra de la proteína, generando distintas poblaciones de multímeros con distintas funcionalidades.

Por otra parte, utilizando un modelo de regeneración hepática como una herramienta que nos permitió seguir la salida y el reingreso a quiescencia de células en el contexto de un tejido, logramos corroborar nuestros datos *in-vitro*. La forma DN-DBC1 se hace menos presente durante la regeneración del hígado con un mínimo a las 36 h que coincide con una disminución estadísticamente significativa de la actividad de SIRT1. Se ha determinado que es importante mantener una correcta regulación de la actividad de SIRT1 para que el proceso

de regeneración hepática transcurra con normalidad¹²⁰. La relación en los niveles de DBC1/DN-DBC1 parece ser una forma rápida y precisa de regulación de la actividad de SIRT1, que permite que el proceso de regeneración transcurra normalmente.

Trabajando con nuestros animales *Dbc1* KO encontramos que estos presentan complicaciones en la regeneración del hígado. La disminución en la actividad de SIRT1 que observamos en los animales WT no está presente en el hígado de los animales KO. Este resultado es coherente con los resultados de otros grupos donde ven que la sobreexpresión de SIRT1 en modelos murinos genera inconvenientes en la regeneración del hígado¹²⁰. No podemos perder de vista que DBC1 tienen múltiples interactores por tanto el efecto que vemos en la regeneración hepática de los animales *Dbc1* KO no puede atribuirse solo a la falta de regulación de SIRT1. En este sentido se han identificado a otros interactores de DBC1 que participan en el proceso de regeneración hepática, como lo son las proteínas p53, PARP1 y el ARN largo no codificante MALAT1^{21,121,122}. DBC1 y DN-DBC1 podrían tener un rol en la regulación de estos factores durante el proceso de regulación hepática.

También vimos que los animales *Dbc1* KO presentan alteraciones en la progresión del ciclo celular durante la regeneración hepática. Esto lo vimos reflejado a nivel de las ciclinas que se encuentran alteradas con respecto a sus niveles en hígados WT. Esto último sumado al retraso en la recuperación de la masa hepática en los animales *Dbc1* KO luego de la cirugía, nos dan el indicio de que los animales KO presentan un retraso en alguna etapa de su ciclo. No haber observado diferencias en la incorporación de la BrdU indica que la ausencia de DBC1 no afectaría la salida de G_0 , el transcurso por G_1 ni su ingreso a S. El análisis histológico de los hígados mostró un menor número de figuras mitóticas en los hígados de animales *Dbc1* KO, por lo que habría un

enlentecimiento en el ciclo que se está dando en la transición G_2/M . Se ha reportado que el noqueo de DBC1 en células es necesario para que la transición G_2/M suceda correctamente¹²³. DBC1 reprime la expresión de genes bajo el dominio del promotor GADD45 que inducen la detención del ciclo en G_2/M ¹²³. Quizás sea este uno de los mecanismos que explique el enlentecimiento observado en la regeneración hepática en animales KO.

Por último queremos destacar que la expresión de una forma u otra de la proteína DBC1 está presente en tejido adiposo y es diferencial en las distintas células que lo componen. En el tejido adiposo de los ratones encontramos que la expresión de DN-DBC1 se hace evidente en la fracción estromal vascular del tejido pero no se observa cuando analizamos la fracción de adipocitos. Esta expresión diferencial podría tener implicancias en la fisiología del tejido adiposo. Nosotros creemos que el procesamiento de DBC1 es un fenómeno dependiente del tipo celular y de la capacidad de las células de reingresar al ciclo. Esto explicaría lo observado en el tejido adiposo de los ratones. La fracción estromal, que cuenta con células precursoras con capacidad de proliferar y diferenciarse mantendría la regulación proteolítica de DBC1. Durante la obesidad estas células proliferan para generar hiperplasia en el tejido adiposo, y mientras esto suceda se sostiene la obesidad saludable. Cuando estas células precursoras se depletan o se vuelven senescentes el tejido pierde su capacidad expansiva y de protección metabólica a nivel sistémico. Como se puede ver en la fracción estromal del tejido adiposo humano se observa que se expresa principalmente DBC1. Este tejido proviene de un paciente con obesidad mórbida sometido a un procedimiento de cirugía bariátrica. Por lo tanto, es probable que la capacidad expansiva del tejido adiposo de este paciente pudiera estar al límite. Esta hipótesis concuerda con lo que se observa en los animales KO con una mayor capacidad de incrementar su masa de tejido adiposo estableciendo un fenotipo de obesidad saludable. Como

mostramos en este trabajo en un principio DN-DBC1 se comporta como una forma inactiva de DBC1. En este sentido, la ausencia de DBC1 en los KO es un equivalente a mantener la expresión de DN-DBC1, preservando la capacidad proliferativa de las células que permiten la expansión del tejido adiposo. Estudiar la dinámica de expresión de DN-DBC1 en tejido adiposo humano y establecer si hay un vínculo con la obesidad saludable es otro aspecto de la función de DBC1 que nos interesa seguir profundizando.

5. Búsqueda de nuevos factores secretados regulados por DBC1

Hoy en día está establecido que la obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de patologías como la diabetes de tipo 2, enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer¹²⁴. Uno de los principales factores que conduce a los obesos a padecer estos trastornos es el desarrollo de resistencia a la insulina¹²⁵. Sin embargo, se estima que entre un 10-25% de los individuos obesos se mantienen metabólicamente saludables³⁵. En particular una característica muy común en los obesos saludables es que mantienen la sensibilidad a la insulina³⁵. Se cree que los individuos obesos saludables, están protegidos metabólicamente por ser capaces de aumentar de peso manteniendo su tejido adiposo funcional³⁵. Las evidencias experimentales sugieren que esto ocurre por dos razones fundamentales. Por un lado, por la conservación de la capacidad de almacenar lípidos y mantener bajos sus niveles en sangre (menor lipólisis), y por otro lado, por el aumento en la secreción de adipocinas con efectos beneficiosos y menor secreción de citoquinas proinflamatorias¹²⁶⁻¹²⁹. Los ratones *Dbc1* KO, al ser alimentados con dietas obesogénicas, presentan una gran ganancia de peso pero mantienen bajos sus niveles de lípidos en sangre y además preservan la sensibilidad a la insulina³². A su vez los *Dbc1* KO obesos mantienen altos sus niveles de adiponectina y bajos niveles de inflamación en el tejido adiposo³². Estas características hacen que los ratones *Dbc1* KO sean un buen modelo de obesidad metabólicamente saludable. Otro de los organismos modelo que desarrollan este fenotipo son los animales *Bbs12* KO. BBS12 es una de las proteínas que participa en la maquinaria molecular de la cilia primaria¹³⁰. Al igual que sucede con los ratones *Dbc1* KO, los ratones *Bbs12* KO, al ser alimentados con dietas obesogénicas, aumentan de peso pero se mantienen sensibles a la insulina, con bajos niveles

de lípidos en sangre y una baja inflamación¹³⁰. Los genes de las proteínas BBS se encuentran alterados en los pacientes con síndrome de Bardet-Biedl, una citopatía que genera varias complicaciones entre ellas obesidad¹³¹. También se ha visto que los ratones KO para la proteína BBS4, que también participa en complejos multiproteicos asociados a la cilia primarias, desarrollan obesidad¹³². El Laboratorio de Genética Molecular Humana del Instituto Pasteur de Montevideo, tiene gran interés en el estudio de las vías moleculares que participan en el funcionamiento de la cilia primaria. En particular, trabajan estudiando el papel de BBS4 y la cilia primaria en el proceso de diferenciación de adipocitos. Ellos encontraron que la proteína BBS4 regula la expresión y secreción de FSTL1, un aspecto relevante para la regulación de las cilia y la diferenciación de células 3T3 a adipocitos¹³³. FSTL1 es una glicoproteína extracelular que cumple funciones en procesos de inmunomodulación, proliferación celular, cardioprotección y vascularización¹³⁴. FSTL1 parece cumplir funciones de señalización y protectoras a nivel paracrino y a distancia, lo que sugiere que FSTL1 puede actuar también como adipocina^{135,136}.

Teniendo en cuenta la confluencia fenotípica entre los modelos KO de DBC1 y BBS y la evidencia de que FSTL1 es una proteína secretada por los adipocitos y regulada por la cilia, nos preguntamos si DBC1 podría participar en los mecanismos de regulación de la secreción de FSTL1. De ser esto así, cabe la posibilidad de que FSTL1 sea una de las moléculas con actividad biológica que favorezca un estado metabólico favorable en los animales obesos saludables. Por su parte, puede que haya múltiples factores secretados con una actividad biológica que colabore en el establecimiento de la obesidad saludable, que sean regulados por DBC1 y que todavía se desconozcan.

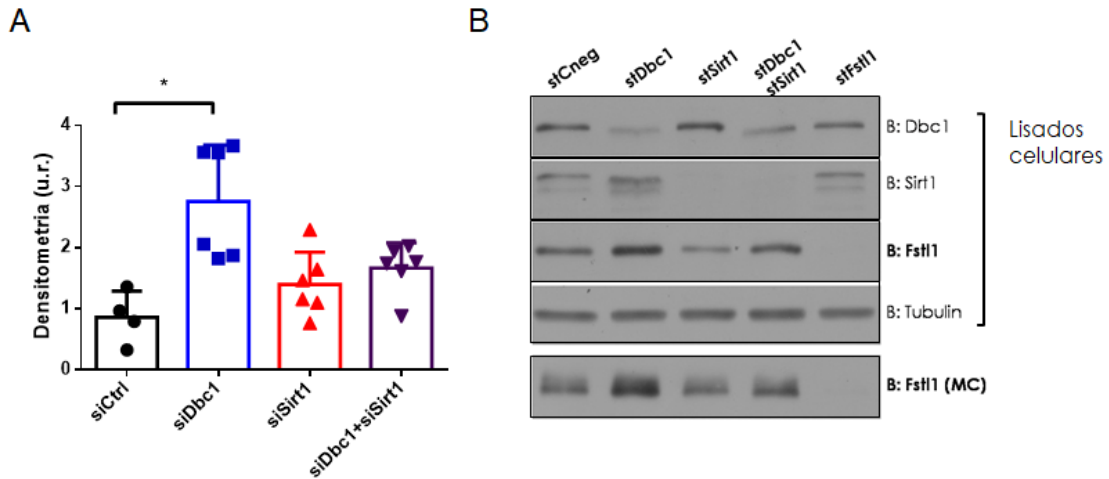
En este capítulo presentamos los resultados obtenidos en búsqueda de encontrar nuevos factores solubles que pudieran colaborar en el mantenimiento

de un metabolismo saludable durante la obesidad. Con esta finalidad decidimos realizar dos abordajes experimentales. Uno de los abordajes fue dirigido, con la intención de explorar un posible vínculo entre FSTL1 y DBC1. El otro abordaje fue no sesgado, analizando el perfil proteómico de los factores presentes en medios condicionados de cultivos celulares. Optamos por realizar el análisis en un modelo sencillo *in-vitro*, como una primera aproximación que nos sirva para comprender el secretoma del tejido adiposo regulado por DBC1. No hay trabajos en la actualidad que presenten evidencias previas en torno a este tema.

5.1 Resultados

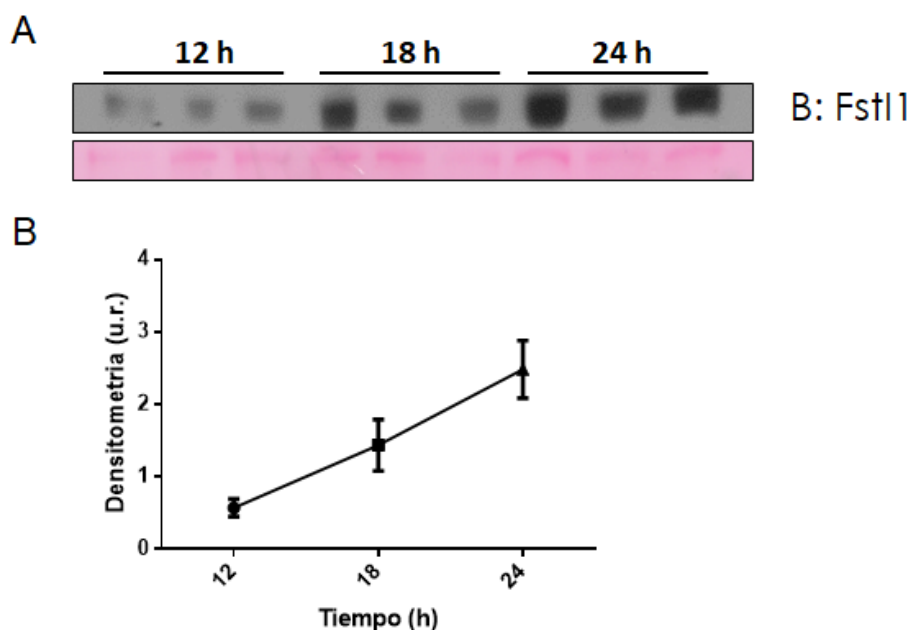
DBC1 regula los niveles de FSTL1 in-vitro

El primer abordaje experimental que realizamos para estudiar el posible vínculo entre FSTL1 y DBC1 fue hacer silenciamientos transitorios de DBC1 en pre-adipocitos. Utilizamos para ellos la línea de células 3T3L1. Esta línea celular de fibroblastos murinos es ampliamente utilizada como modelo de diferenciación de adipocitos¹³⁷. Pusimos a punto el silenciamiento de Dbc1, Fstl1 y Sirt1 mediante la utilización de ARN de silenciamiento (siARN). En la Figura 5.1 presentamos resultados de los experimentos de silenciamiento donde se aprecia como al silenciar Dbc1, vimos los niveles de Fstl1 incrementados en el medio de cultivo con respecto a la condición control. Exploramos la posibilidad de que Sirt1 participará en este aumento de la secreción de Fstl1 mediada por Dbc1. Para eso silenciamos en conjunto a Dbc1 y Sirt1 en las 3T3L1.



5.1 Niveles de Fstl1 en medios condicionados de células 3T3 L1 silenciadas En A se muestra la cuantificación por densitometría de Fstl1 en los medios condicionados de células 3T3 silenciadas para Dbc1 y Sirt1. Análisis conjunto de datos de dos experimentos independientes. Las variaciones en los niveles de Fstl1 se expresan como la relación cantidad de Fstl1 de cada una de las condiciones con respecto al control. En B un western blot representativo de los resultados obtenidos para la cuantificación. ANOVA de una vía.

En la figura 5.1 se puede ver que los niveles de Fstl1 en el medio extracelular no se ven alterados con respecto al control cuando silenciamos a Sirt1. Cuando silenciamos DBC1, observamos un incremento significativo en la secreción de Fstl1. Este efecto se perdió cuando Dbc1 y Sirt1 fueron silenciadas al mismo tiempo, demostrando que la secreción de Fstl1 es regulada por Dbc1 en un mecanismo dependiente de Sirt1.



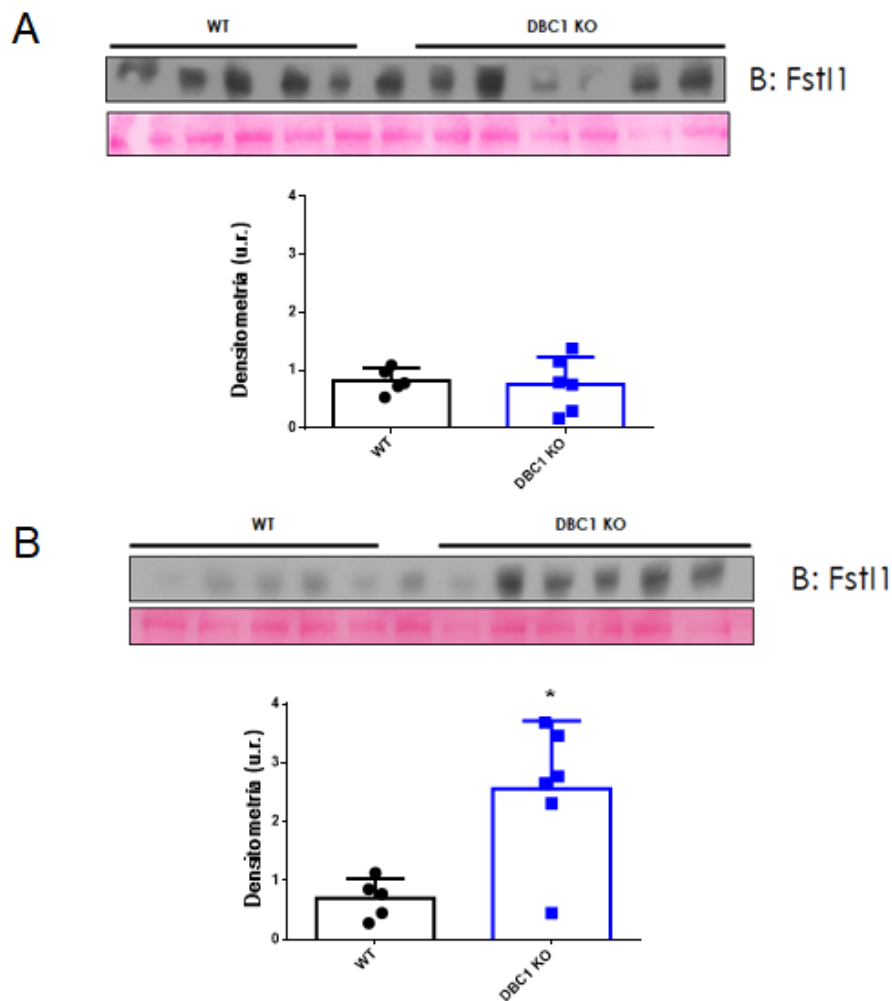
5.2 Puesta a punto de la cuantificación de Fstl1 en medios condicionados de explantos de tejido adiposo de ratón WT Se muestra la optimización de la detección de los niveles de Fstl1 en explantos de tejido fresco. En este caso se analizaron los medios condicionados de tres animales diferentes durante 24 h. La densitometría se realizó cuantificando la relación entre la banda del western y una banda de la membrana teñida con rojo de Ponceau.

Fstl1 se detecta aumentada en el tejido adiposo blanco y sangre de ratones Dbc1 KO

Teniendo en cuenta el resultado en células, fuimos a evaluar si la regulación Dbc1 sobre la Fstl1 secretada también ocurría en el tejidos adiposo de los ratones. Con ese fin realizamos experimentos *ex-vivo* donde utilizamos tejido adiposo de ratones WT y Dbc1 KO y medimos por western blot los niveles de Fstl1 en el medio condicionado de los explantos de estos tejidos en cultivo.

Primero pusimos a punto el tiempo en que debíamos mantener los explantos en cultivo para detectar Fstl1. En la figura 5.2 se observa la cuantificación Fstl1 en la puesta a punto de estos experimentos. Trabajamos con explantos de 100 mg de tejido adiposo blanco y tomamos muestras de medio de cultivo a las 12 , 18 y 24 horas. Según los resultados que obtuvimos en nuestra puesta a punto

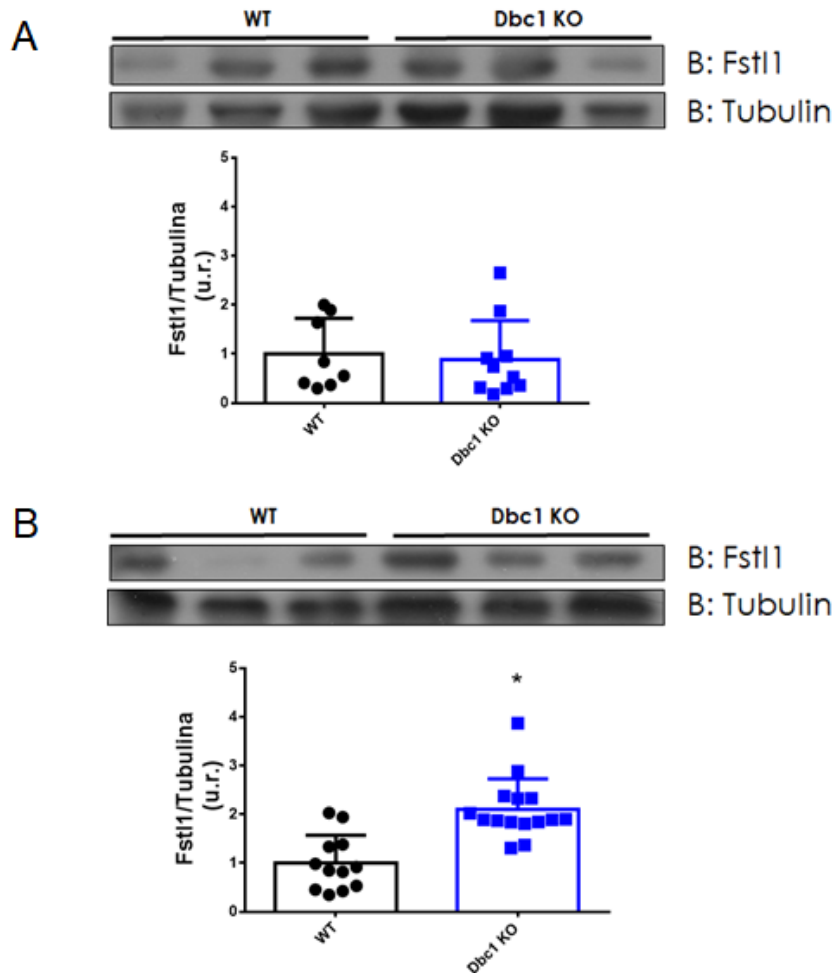
decidimos tomar las muestras de medio a las 18 h de incubación luego de iniciar con el cultivo de los explantos. Tuvimos en cuenta que a ese tiempo posiblemente estábamos dentro de un rango dinámico adecuado para poder realizar las cuantificaciones por western blot.



5.3 Niveles de Fstl1 en los medios condicionados de explantos de distintos depósitos de tejido adiposo de ratones WT y *Dbc1* KO En A se presentan los resultados para la cuantificación de Fstl1 en los medios condicionados de ex plantos de tejido adiposo subcutáneo y en B para tejido adiposo perigonadal. *p<0,05 en t-test.

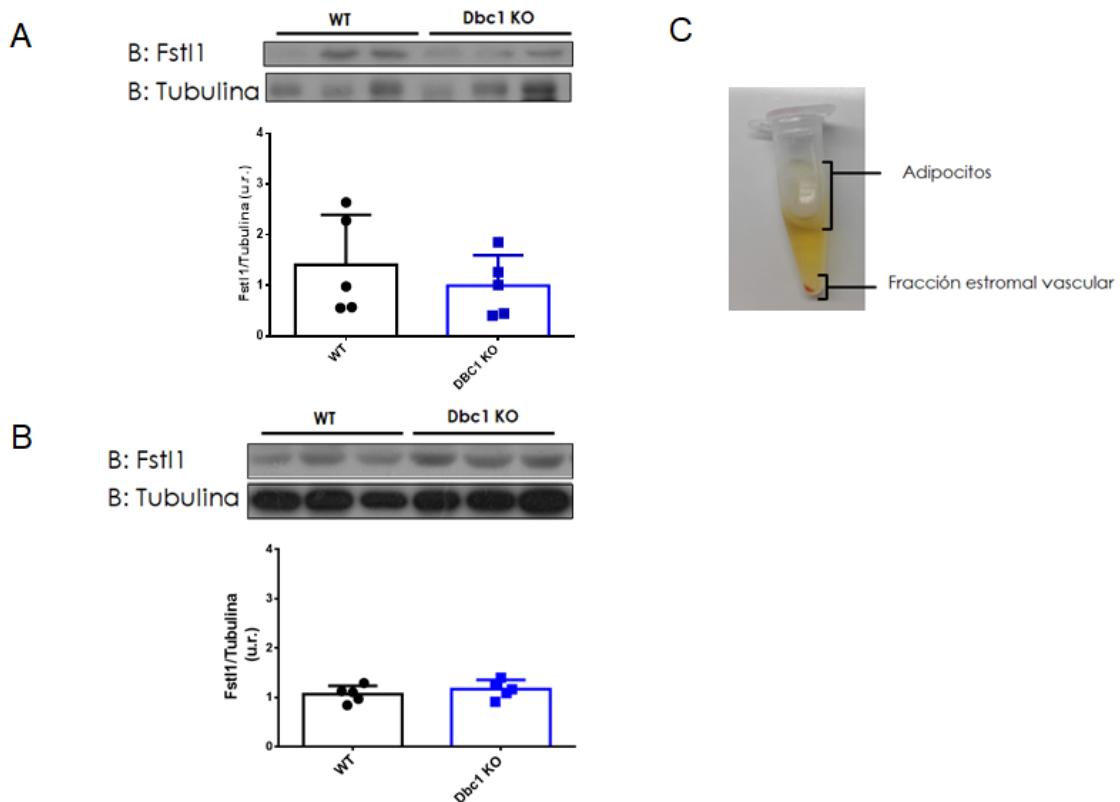
En el siguiente paso medimos los niveles de Fstl1 en explantos tomados de la grasa subcutánea y perigonadal de ratones WT y *Dbc1* KO. No detectamos

diferencias en las cantidades de Fstl1 liberadas al medio entre explantos WT y KO para el caso de la grasa subcutánea. Sin embargo, observamos de una manera muy clara que el tejido adiposo perigonadal de los animales que no expresan Dbc1 secretan mayores niveles de Fstl1.



5.4 Niveles de Fstl1 en lisados de tejido adiposo total de distintos depósitos en animales WT y Dbc1 KO En A se presentan los resultados para la cuantificación de Fstl1 en lisados de tejido adiposo subcutáneo y en B para tejido adiposo perigonadal. Para el subcutáneo se analizaron en conjunto los datos de dos experimentos independientes y de tres experimentos para el caso de la grasa perigonadal. Las cuantificaciones se expresan en relación a los niveles de Fstl1 en los animales WT. Las imágenes de western blot son representativas de los experimentos. *p<0,05 en t-test.

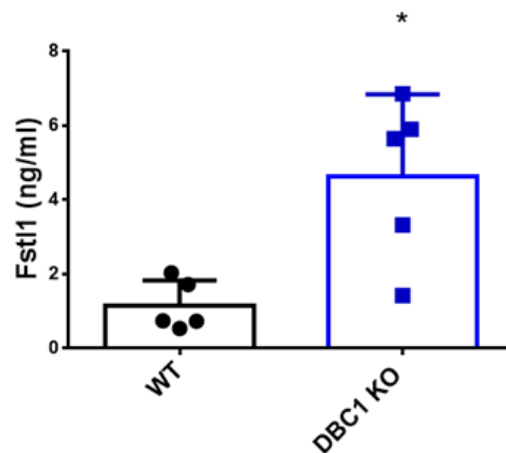
El aumento en la secreción de Fstl1 *ex-vivo*, exclusivamente en la grasa perigonadal, concuerda con los niveles de Fstl1 que detectamos en los lisados de tejido adiposo total. En la misma dirección de lo que observamos con los explantos, cuando realizamos western blot de lisados de tejido adiposo subcutáneo no encontramos diferencias en los niveles de Fstl1. En cambio en el tejido adiposo perigonadal de los animales *Dbc1* KO encontramos aumentada la expresión de Fstl1. Esto confirma que existe una expresión diferencial de Fstl1 en distintos depósitos de tejido adiposo blanco de los animales *Dbc1* KO. Es en el tejido adiposo perigonadal donde Fstl1 se expresa aumentada con respecto al mismo depósito de tejido en los animales WT.



5.5 Niveles de Fstl1 en adipocitos y en la fracción estromal vascular de tejido adiposo perigonadal de ratones WT y *Dbc1* KO Se presentan los resultados de western blot y la cuantificación de Fstl1 en homogenizados de adipocitos provenientes de tejido adiposo perigonadal en A y homogenizados de la fracción estromal vascular del mismo tejido. En C se

muestra una fotografía del aspecto que tienen las fracciones utilizadas en este experimento luego de digerir el tejido adiposo con colagenasa. N=5 por condición t-test.

Habiendo determinado que el tejido adiposo perigonadal de los animales *Dbc1* KO expresa más Fstl1 con respecto al control, separamos los adipocitos de la fracción estromal vascular para saber cual de estos componentes es el responsable de producir a la proteína. En la figura 5.5 podemos ver el resultado de las cuantificaciones de Fstl1 en las distintas fracciones. Esta vez no encontramos diferencias en la expresión de Fstl1 entre WT y *Dbc1* KO. Este resultado indica que las diferencias de expresión que observamos tanto en tejido adiposo blanco perigonadal total como en proteína secretada por los explantos del mismo tejido se pierde cuando fraccionamos al tejido. Este resultado inesperado nos hace pensar que *Dbc1* pueda estar regulando la secreción de Fstl1 pero que de alguna forma los niveles intracelulares de la proteína no se ven alterados.

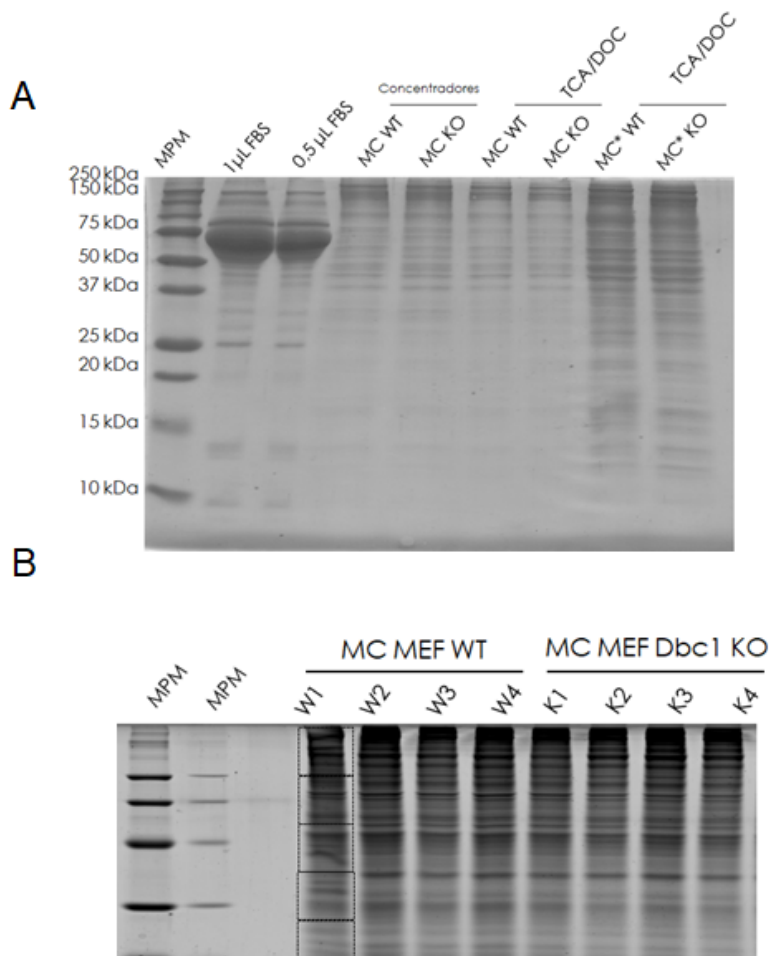


5.7 Niveles de Fstl1 en suero de ratones WT y *Dbc1* KO Resultados de cuantificación de los niveles de Fstl1 en sangre de los ratones cuantificado utilizando un kit de ELISA comercial.* $p < 0,05$ en t-test.

Por último, teniendo en cuenta que Fstl1 es una proteína que circula por el torrente sanguíneo y puede tener un efecto a distancia, medimos por ELISA los niveles de la proteína en plasma de animales WT y *Dbc1* KO. En la figura 5.7 se muestra la cuantificación donde vimos que los niveles de Fstl1 en plasma estaban elevados en los *Dbc1* KO. Pudimos concluir por lo tanto que los niveles de Fstl1 se encuentran incrementados en sangre en los animales *Dbc1* KO.

Perfil secretómico de células MEF WT y Dbc1 KO

Otro camino que recorrimos en nuestra búsqueda de moléculas secretadas reguladas por DBC1, fue el análisis del perfil de proteínas presentes en los medios de cultivos condicionados de células MEF WT y *Dbc1* KO. Para la identificación de las proteínas en nuestros medios empleamos espectrometría de masas

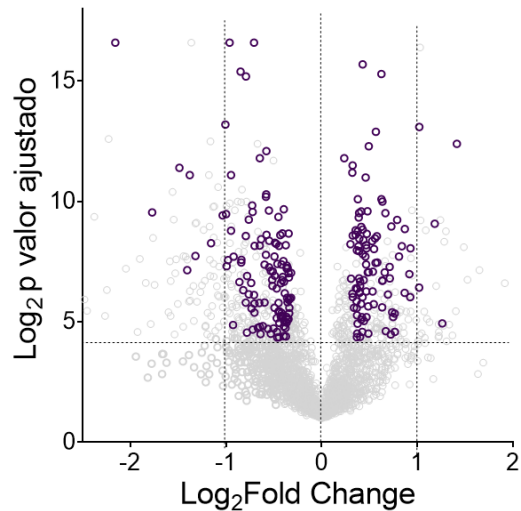
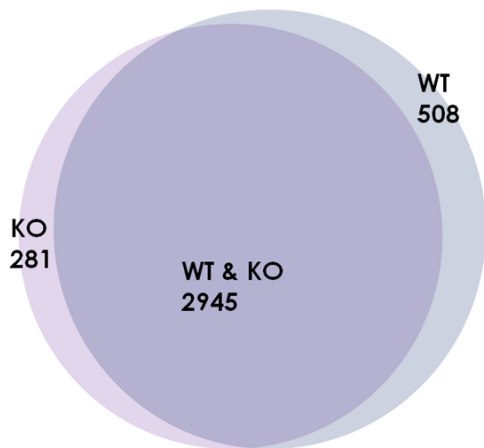


5.8 Puesta a punto de preparación de las muestras para realizar espectrometría Se presentan dos imágenes de geles de SDS-PAGE teñido con azul de coomassie coloidal. En A se compara la cantidad de proteína de 1 y 0,5 µl de SFB con la cantidad de proteínas que se detectan en 5 ml de medio de cultivo libre SFB. También se comparan dos métodos de concentración de proteínas en la muestra, con tubos concentradores con membranas con corte de 2,5 kd o precipitaciones con tricloroacético y deoxicolato. Por último también se compara las proteínas presentes en medio condicionado (MC) de MEF en pasaje 5 y MC* de células en pasaje 3. En B se muestran los perfiles electroforéticos de los medios condicionados analizados en el espectrómetro. Las marcas punteadas muestran cómo se fraccionó cada carril del gel para extraer por separado sus proteínas.

En primera instancia fue necesario poner a punto la obtención y preparación de las muestras para espectrometría. Con esta finalidad, cultivamos las células en

condiciones que eviten la saturación de nuestros espectros con señales provenientes de proteínas del suero fetal bovino (medio con suero reducido). Esto es un procedimiento necesario, ya que las proteínas del suero enmascaran la presencia de proteínas menos abundantes, impidiendo su identificación en la muestra¹³⁸. Por otra parte, optimizamos el método de concentración de las proteínas presentes en los medios condicionales. Esto último se hace necesario a los efectos de acumular a las proteínas que se secretan en bajas cantidades. En la figura 5.8 A se presenta el resultado de nuestra puesta a punto. Como se puede apreciar vimos que las cantidades de proteína que aporta el suero fetal eran muy altas aún agregando volúmenes muy pequeños de suero. Definimos lavar con PBS cinco veces nuestros cultivos y luego incubar las células con medio fresco sin SFB. Como también se puede apreciar en el gel que se presenta en la figura 5.8A el método que nos resultó más eficiente para concentrar las proteínas fue la precipitación con ácido tricloroacético. Otro factor importante que tuvimos en cuenta para realizar nuestros experimentos, fue siempre trabajar con células con un máximo de tres pasajes. Esto es debido a que observamos que en pasajes mayores los medios condicionados presentan una menor cantidad de proteínas en el medio condicionado.

Como resultado, preparamos nuestras muestras creciendo células MEF WT y *Dbc1* KO en medio libre de SFB durante 16h. Concentramos las proteínas de los medios condicionados y los resuspendimos en amortiguador Laemmli. Las cuatro muestras de cada condición fueron corridas en el gel de electroforesis y cada carril fue seccionado en 5 partes (Fig. 5.8B) que se procesaron por separado, para su inyección en el Orbitrap según se describe en materiales y métodos.



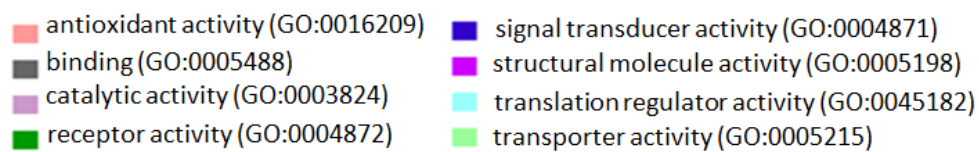
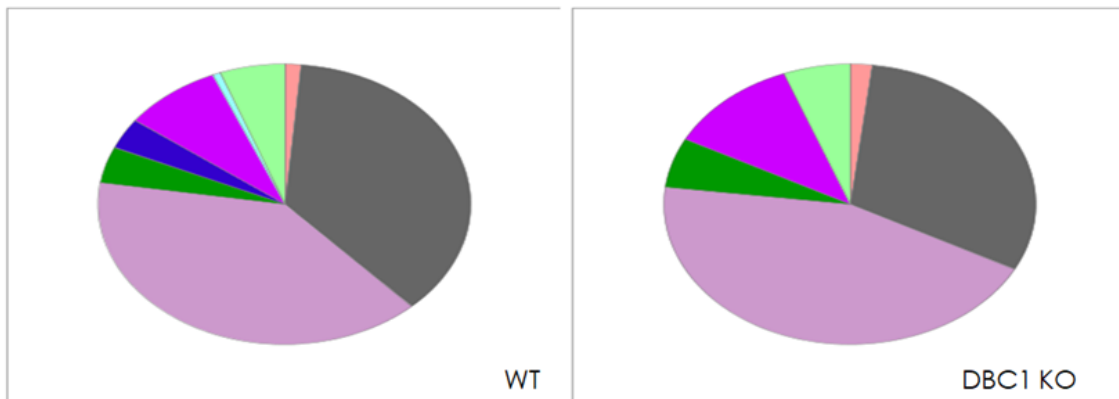
5.9 Resultados del análisis de espectrometría de masas A se muestra un diagrama de Venn de las proteínas detectadas en una condición y otra. En B se muestran los niveles de expresión cuantificados por conteo de espectros representados en un *volcano plot*. Cada punto representa una proteína identificada. Los puntos violetes se corresponden con las proteínas que se expresan diferencialmente de manera estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre las dos condiciones.

Utilizamos el módulo de diagrama de Venn del programa Pattern Lab para determinar las proteínas representadas únicamente en cada condición utilizando un valor de probabilidad menor que 0,05 en las opciones de filtrado. En nuestro análisis identificamos 3226 y 3400 proteínas en la condición WT y KO respectivamente. En la figura 5.9A se presenta un diagrama de Venn donde se puede apreciar que 2945 proteínas estaban representadas en ambas condiciones. Su abundancia relativa en cada condición fue determinada por conteo de espectros en el módulo TFold del Pattern Lab según los métodos reportados en¹⁰¹. Se consideraron las proteínas presentes en 5 de un total de 8 réplicas entre ambas condiciones. Son 218 proteínas las que se expresaron diferencialmente de manera estadísticamente significativa. Estas proteínas están representadas en el volcano plot de la figura 5.9B. A pesar de haber detectado un alto número de proteínas, la mayoría de ellas no se encuentran anotadas en las bases de datos disponibles como proteínas extracelulares o asociadas a

vesículas. Cabe mencionar que los cultivos fueron inspeccionados al microscopio previo a coleccionar los medios condicionados, verificando que las células presentaran un aspecto normal. Si bien observamos algunas células muertas o vacuoladas, en líneas generales se veía que los cultivos estaban sanos. Decidimos entonces depurar nuestras listas excluyendo a las proteínas que no se encuentran anotadas en Uniprot como localizadas en exosomas, vesículas extracelulares, membrana de estas vesículas, en la matriz extracelular y en el espacio extracelular. Del filtrado manual de estos datos encontramos 182 proteínas secretadas en los medios condicionados de las células WT y 72 en los medios de las *Dbc1* KO. Utilizando estas listas de proteínas extracelulares realizamos un análisis de ontología génica utilizando el programa. En la figura 5.10 se muestran gráficos donde se muestran proporcionalmente las funciones moleculares atribuibles a las proteínas identificadas en nuestros secretomas. En este no se evidencian grandes diferencias entre las dos condiciones. Sin embargo, el secretoma de las células WT presenta un componente asociado a la transducción de señales que no está presente en el secretoma de las células *Dbc1* KO. El gen que produce que se diferencien en este aspecto es la proteína *Sfrp2*, que es expresada exclusivamente por las células WT.

Total # Genes 180 Total # function hits 142

Total # Genes 72 Total # function hits 52



5.10 Ontología génica de los secretomas por funciones moleculares Gráficos donde se esquematiza la proporción de funciones moleculares representadas en nuestros secretomas según la clasificación por ontología génica del total de proteínas secretadas detectadas en nuestro análisis

Si nos enfocamos en las proteínas que están reportadas como extracelulares, y que se expresan diferencialmente por encima de dos veces entre condiciones, encontramos algunas que llaman la atención. Varias de estas se han vinculado a la regulación del metabolismo, la inflamación y la remodelación de la matriz extracelular. Las MEF *Dbc1* KO secretan cinco veces menos a la proteína PCSK9, una proteína involucrada en el reciclaje del receptor de LDL en el hígado¹³⁹. ISG15 es una citoquina proinflamatoria inducida por IFNs de tipo I y secretada por diferentes tipos celulares que también se encuentra significativamente menos expresada por las células *Dbc1* KO¹⁴⁰. Encontramos que las células WT producen mayores niveles de elastina que las *Dbc1* KO. La elastina cumple un rol fundamental en la estructura del tejido vascular y alteraciones de su función tienen implicancias en desórdenes cardiovasculares¹⁴¹. Otra de las proteínas que se encuentra más expresada en los secretomas de las células WT es ADAMTS5,

sobre la cual hay reportes donde se le atribuye funciones a nivel del metabolismo¹⁴². Las otras proteína que se encuentran dos veces menos representadas en los medios condicionados de las células que expresan DBC1 son proteínas vinculadas a la diferenciación de osteoclastos, proteínas de matriz extracelular¹⁴³, y otras proteínas que se han asociado al desarrollo de trastornos del envejecimiento¹⁴⁴

Tabla 2.1 Proteínas incrementadas en el secretoma de MEF WT con respecto a las MEF Dbc1 KO

UniProt ID#	FC*	Nombre de la proteína
Q80W65	5.0	Proprotein convertase subtilisin/kexin type
Q64339	3.6	Ubiquitin-like protein ISG15
P54320	3.2	Elastin
Q9CXD9	2.5	Leucine-rich repeat-containing protein
Q9R001	2.4	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5
P02463	2.4	Collagen alpha-1(IV) chain
P22005	2.4	Proenkephalin-A
Q8BJD1	2.1	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain
P08121	2.0	Collagen alpha-1(III) chain
Q8HWB2	2.0	Histocompatibility 2, Q region locus 4
Q3U962	2.0	Collagen alpha-2(V) chain
O08746	1.9	Matrilin-2
P97299	1.9	Secreted frizzled-related protein 2
D3YVL0	1.9	Putative helicase MOV-10
M0QWP1	1.8	Agrin

Código de identificación de la proteína en la base de datos de UniProt

* Fold Change respecto a la condición KO

4.2 Discusión

Encontramos que DBC1 regula la secreción de Fstl1 en un modelo de pre-adipocitos en cultivo. Nuestros experimentos *in-vitro* indican que el aumento en los niveles de Fstl1 secretada, al disminuir la expresión de Dbc1, es mediado por la acción de la enzima Sirt1. También vimos aumentados los niveles de Fstl1 en plasma de animales *Dbc1* KO. Este aumento de Fstl1 es interesante teniendo en cuenta el rol cardioprotector que se le atribuye a la proteína en lo que respecta a la regeneración del daño cardíaco¹⁴⁵. Analizamos también los niveles de Fstl1 producidos por el tejido adiposo blanco de los animales *Dbc1* KO y WT. No encontramos diferencias en los niveles de secreción de Fstl1 en el tejido adiposo subcutáneo. Tampoco encontramos diferencia en la cantidad de Fstl1 en los extractos de tejido adiposo blanco subcutáneo total. Sin embargo, hallamos que el tejido adiposo perigonadal de los ratones KO secreta mayor cantidad de Fstl1. Este aumento en los niveles de la proteína secretada también se observa en los lisados de tejido adiposo blanco perigonadal. Se conoce que los diferentes depósitos de tejido adiposo secretan distintos niveles de adipoquinas¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. No es clara la relevancia biológica de que en el tejido adiposo perigonadal aumente la secreción de Fstl1 en ausencia de Dbc1. Por un lado es paradójico que el tejido adiposo de los animales *Dbc1* KO exprese mayores concentraciones de un factor que se ha visto juega un papel proinflamatorio a nivel del tejido adiposo teniendo en cuenta la baja inflamación que presentan los *Dbc1* KO en este tejido^{32,149}. A pesar de esto, también se ha visto que FSTL1 puede estar disminuyendo la inflamación en determinados contextos¹⁵⁰. Por otro lado, sabemos que los pre-adipocitos expresan niveles altos de FSTL1 y la expresión disminuye ante la diferenciación a adipocitos¹⁵¹. De hecho se ha reportado que los pacientes con la capacidad expansiva del tejido adiposo a límite, presentan una disminución en los niveles

de Fstl1¹⁵². Los mayores niveles de Fstl1 pueden estar reflejando la capacidad que tienen el tejido adiposo de los ratones *Dbc1* KO de seguir expandiéndose.

Cuando intentamos identificar qué componentes del tejido adiposo son los responsables de secretar mayores niveles de Fstl1, nos encontramos con que no había diferencias entre la fracción estromal vascular y los adipocitos del tejido adiposo perigonadal de animales *Dbc1* KO y WT. Esto podría deberse a que DBC1 esté actuando a nivel las vías de secreción de Fstl1 y que el aumento detectado en el tejido adiposo total se deba a una acumulación de la proteína en el espacio intersticial. De ser así las células responsables de la secreción de Fstl1 deberían estar compensando la síntesis y degradación de la proteína manteniendo los niveles de Fstl1 intracelular en un estado estacionario. La confirmación de esta hipótesis no fue abordada durante el desarrollo de esta tesis.

En nuestro análisis proteómico para encontrar factores secretados que están regulados por DBC1, encontramos algunos candidatos que nos resultaron interesantes. Sin embargo, debemos considerar que las condiciones en las que se realizaron los cultivos para evitar la interferencia de las proteínas del suero fetal bovino, pueden haber generado un sesgo en nuestros resultados. Por un lado los sucesivos lavados con PBS sumados a la ausencia de suero inevitablemente generan lisis celular, y aumentan los niveles de proteínas citosólicas en el medio extracelular. Aún niveles bajos de lisis celular pueden enriquecer de proteínas citoplasmáticas a nuestros medios condicionados. Esto puede evitar que se detecten proteínas secretadas que estén representadas en baja proporción en los medios condicionados. Para nuestro caso particular otra desventaja de haber trabajado en ausencia de suero, es la inducción de la quiescencia como un efecto no deseado. Como comentamos más arriba, en las MEF quiescentes predomina la forma DN-DBC1 que pierde su capacidad de unión a SIRT1 y

probablemente a varios otros interactores. Por lo tanto, en ausencia de suero es probable que algunos efectos diferenciales entre genotipos WT y KO se estén perdiendo. Por último, la ausencia de suero inevitablemente genera cambios a nivel del metabolismo celular que van a afectar los perfiles de proteínas secretadas por las células¹⁵³.

Aún teniendo en cuenta las limitaciones técnicas de nuestros análisis proteómicos, identificamos varias proteínas que están aumentadas en las células con DBC1. Encontramos que las células *Dbc1* KO expresan menores niveles de proteínas de matriz extracelular lo que puede explicar en parte otras observaciones realizadas por nuestro grupo con respecto a las funciones de DBC1 en la fisiología del tejido vascular¹⁵⁴. Las disecciones aórticas son un tipo de lesión vascular caracterizadas por el debilitamiento y la ruptura de la pared vascular. En los ratones *Dbc1* KO tratados con angiotensina se observa un incremento en la ocurrencia de disecciones aórticas¹⁵⁴. La disminución en la secreción de componentes de la matriz, como elastina y las fibras de colágeno que observamos en nuestros secretomas, pueden ser uno de los factores que hacen que los ratones KO presenten este tipo de lesiones con mayor frecuencia.

Por otro lado, la expansión del tejido adiposo durante la obesidad se acompaña de cambios en la arquitectura de la matriz extracelular que durante la expansión del tejido pueden presentar desbalances que afectan su función¹⁵⁵. En este sentido la menor expresión de proteínas de matriz extracelular puede estar favoreciendo en la expansión del tejido adiposo de los animales KO, colaborando a evitar la fibrosis que perjudica el funcionamiento del tejido^{156,157}.

Otra proteína que se encuentra significativamente reducida en los secretomas de las células KO es ADAMTS5, una metaloproteinasa involucrada en procesos de remodelación de la matriz extracelular¹⁵⁸. Se ha detectado que los niveles de esta proteína se ven disminuidos a nivel de la aorta y en el plasma de los

pacientes que sufren disecciones aórticas agudas¹⁵⁹. Por otra parte se ha reportado que los ratones deficientes en *Adamts5* presentan menos esteatosis hepática y una mayor sensibilidad a la insulina cuando son alimentados con dietas obesogénicas^{142,160}. Si bien debemos confirmarlo *in-vivo*, un descenso en los niveles de *Adamts5* podría ser un factor que contribuya a generar el fenotipo metabólico observado en los ratones *Dbc1* KO. Además las MEF KO secretan menores niveles de *Isg5*, una proteína pro-inflamatoria cuya expresión aumenta en los adipocitos durante la obesidad¹⁶¹. Una proteína que resultó estar fuertemente aumentada en los secretomas de células MEF WT fue *Pcsk9*. Como ya mencionamos esta proteína interfiere con la remoción de las partículas de LDL del torrente sanguíneo¹³⁹. Esto es interesante teniendo en cuenta que la hipercolesterolemia es uno de los rasgos ausente en algunos cuadros de obesidad saludable. De hecho la PCSK9 es un blanco terapéutico en el desarrollo de tratamientos contra la hipercolesterolemia¹⁶².

Por último, vale mencionar que el análisis global de las proteínas identificadas en nuestros secretomas indica que hay componentes de la vía Wnt que se expresan diferencialmente entre condiciones. Estas diferencias son esperables si tenemos en cuenta que *Dbc1* interviene en la vía regulando la actividad de β -catenina^{42,67,82}.

En resumen, encontramos que *Fstl1* es una adipoquina regulada por DBC1 en su secreción específicamente en el tejido adiposo perigonadal. Esta regulación es SIRT1 dependiente. Más experimentos serán necesarios para entender cómo se regula la secreción y qué componentes del tejido adiposo son responsables de la producción de *Fstl1*. Además encontramos varios factores secretados por células MEF disminuidos en las células KO, que podrían explicar algunas de las características que se observan en los animales DBC1 KO. Sería interesante medir algunos de estos factores en el plasma y el tejido adiposo de ratón para

confirmar si son adipoquinas o si pueden estar siendo secretadas por otros tejidos.

6. Generación de un ratón knockout condicional para *Dbc1*

Hace treinta años del primer ratón *knockout whole body* (KO) generado por ingeniería genética¹⁶³, y desde ese entonces se han desarrollado cientos de líneas de ratones con genes modificados o transgénicos. Este tipo de reactivo biológico es tan importante que el desarrollo tecnológico necesario para su obtención fue reconocido en 2007 con el premio nobel de fisiología y medicina¹⁶⁴.

La utilización de modelos animales KO permite estudiar cambios en la fisiología y el comportamiento del animal e inferir las funciones de los genes inactivados. De hecho son de gran ayuda a la hora de comprender los procesos en los que participan estos genes a nivel de un tejido específico y en la comunicación entre distintos tejidos.

Aún así, hay ocasiones en las que los modelos de ratones KO no son suficientes para entender completamente cuál es el rol de un gen. En ocasiones sucede que el efecto observado en la fisiología de un tejido puede verse afectado o ser consecuencia de la pérdida de función del gen de interés en otro órgano. Esto puede generar dificultades en el estudio de fenotipos metabólicos, que dependen de la coordinación de varios tejidos. Para poner un ejemplo, el noqueo del receptor de insulina (IR) en todo el organismo produce que los ratones padezcan una gran desregulación metabólica caracterizada por una falla pancreática y cetoacidosis, que produce la muerte de los animales a los pocos días de nacer^{165,166}. La utilización de KO tejido específicos para IR permitió disecar el efecto de la desregulación en la señalización por insulina en los distintos tejidos, y el efecto que tiene a distancia sobre otros tejidos. Por un lado, el KO tejido específico de IR en músculo induce sensibilidad a la insulina en tejido adiposo¹⁶⁷. En cambio, el KO de IR en el hígado induce intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina en el tejido adiposo y el músculo¹⁶⁸. En

cambio el noqueo en hígado desencadena hiperinsulinemia, algo que no sucede al noquear en el músculo^{167,168}. A su vez, el noqueo del IR en el tejido adiposo no afecta la sensibilidad a la insulina a nivel sistémico ni intolerancia a la glucosa¹⁶⁹. Este caso particular, demuestra la potencia de los modelos de noqueo tejido específico, como herramienta para diseccionar las vías y mecanismos de los procesos del metabolismo energético a nivel sistémico.

En definitiva, los modelos cKO, posibilitan inactivar la expresión de un gen en un tejido específico manteniendo la función normal del gen de interés en el resto de los tejidos del animal. A la vez, permiten la regulación temporal de la expresión del gen, pudiendo ser inactivado en el momento que se considere más adecuado en función del estudio que se quiera realizar.

Para nuestro caso, el ratón *Dbc1* KO ha servido de gran ayuda para entender múltiples aspectos de la biología de la proteína DBC1. Es evidente que DBC1 juega un papel importante en el metabolismo. El fenotipo observado cuando los animales son alimentados con dietas ricas en grasa sugiere que la falta de DBC1 genera una protección metabólica producto de las funciones que está cumpliendo la proteína en distintos tejidos. Sin embargo, para confirmar lo que ya sabemos sobre DBC1 y para avanzar en la comprensión de los procesos en que la proteína participa, nuestro modelo de KO *whole body* es limitado. Por todas estas razones fue que nos propusimos a generar un ratón *Dbc1* KO condicional, un animal que nos permitirá silenciar la expresión de la proteína en los tejidos que sea necesario, para dar respuesta a las preguntas que hasta ahora no hemos podido responder, y a las que seguirán surgiendo más adelante.

6.1 Resultados

Para regular la expresión del gen fue necesario insertar un par de sitios *loxP* en regiones intrónicas, de manera que la expresión normal del gen no se viera afectada. Los sitios *loxP* son secuencias de 34 pb que son reconocidas por la enzima recombinasa Cre¹⁷⁰. El sistema Cre-*loxP* proviene de los bacteriófagos P1 y son herramientas ampliamente utilizadas en biología molecular. La enzima Cre reconoce pares de sitios *loxP* en el ADN y, según sea la orientación y localización de estos sitios, cataliza la eliminación del fragmento de ADN que se encuentra entre ambos sitios *loxP* (Fig. 6.1). Para anular la expresión de una proteína buscamos que la eliminación de parte de secuencia original del gen, ocasiona no solo la pérdida de un fragmento codificante sino también un corrimiento en el marco abierto de lectura generando un codón de terminación de la traducción prematuro. De esta manera, si regulamos en que tejido y en qué momento se expresa la Cre en un ratón cKO podemos regular la eliminación de un gen particular de manera temporal y espacial.

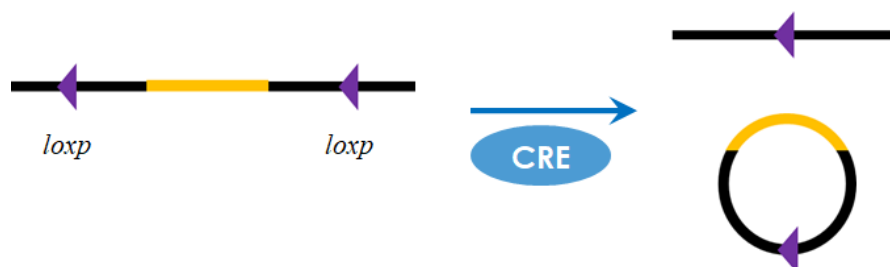


Figura 6.1 Esquema del funcionamiento de del sistema CRE/*loxP*

El primer paso que dimos para el diseño de nuestro ratón *Dbc1* cKO fue analizar la estructura del gen de DBC1 de ratón (*Dbc1*). En el ratón, *Dbc1* se encuentra en la hebra negativa del cromosoma 14. Tiene un largo aproximado de 15 Kpb y se estructura en 21 exones (Gene ID: 219158). En la figura 6.2A se muestra un esquema de la estructura del gen. El codón de inicio de la traducción se encuentra en el exón 2. Determinamos que para nuestros fines era

conveniente flanquear con los sitios *loxP* al exón 3. La eliminación de este exón genera un corrimiento en el marco abierto de lectura, que introduce un codón de terminación prematuro. Verificamos que no existieran codones de inicio de la traducción luego de eliminar el exón 3, en los tres marcos abiertos de lectura. El ARNm maduro que se produce luego de la eliminación del exón 3 codifica solamente los primeros 35 aa de la proteína Dbc1.

Para introducir los sitios *loxP* utilizamos la técnica de CRISPR/Cas9. Nuestra estrategia inicial fue generar dos cortes en la doble hebra de ADN en regiones flanqueantes al exón 3, en presencia de oligos de ADN con la secuencia *loxP* que fueran utilizados por la maquinaria celular de reparación del ADN por recombinación homóloga. Presentamos una visión esquemática del procedimiento de la generación del KO condicional en la figura 6.2B.

Hay disponibles distintos programas de acceso libre que permiten el diseño de ARN guías (ARNg) para CRISPR/Cas9. Los ARNg deben de tener secuencias complementarias a la región donde se busca que la Cas9 corte al ADN. Son estos ARNg los que dirigen el sitio específico de la Cas9. Los programas de diseño de ARNg buscan secuencias en el ADN genómico del organismo que se busca editar, que cumplen principalmente dos criterios; deben estar contiguas a un motivo adyacente proto-espaciador (PAM según su sigla en inglés) y deben tener baja probabilidad de generar cortes no específicos en sitios del genoma distintos a los que se quieren editar.

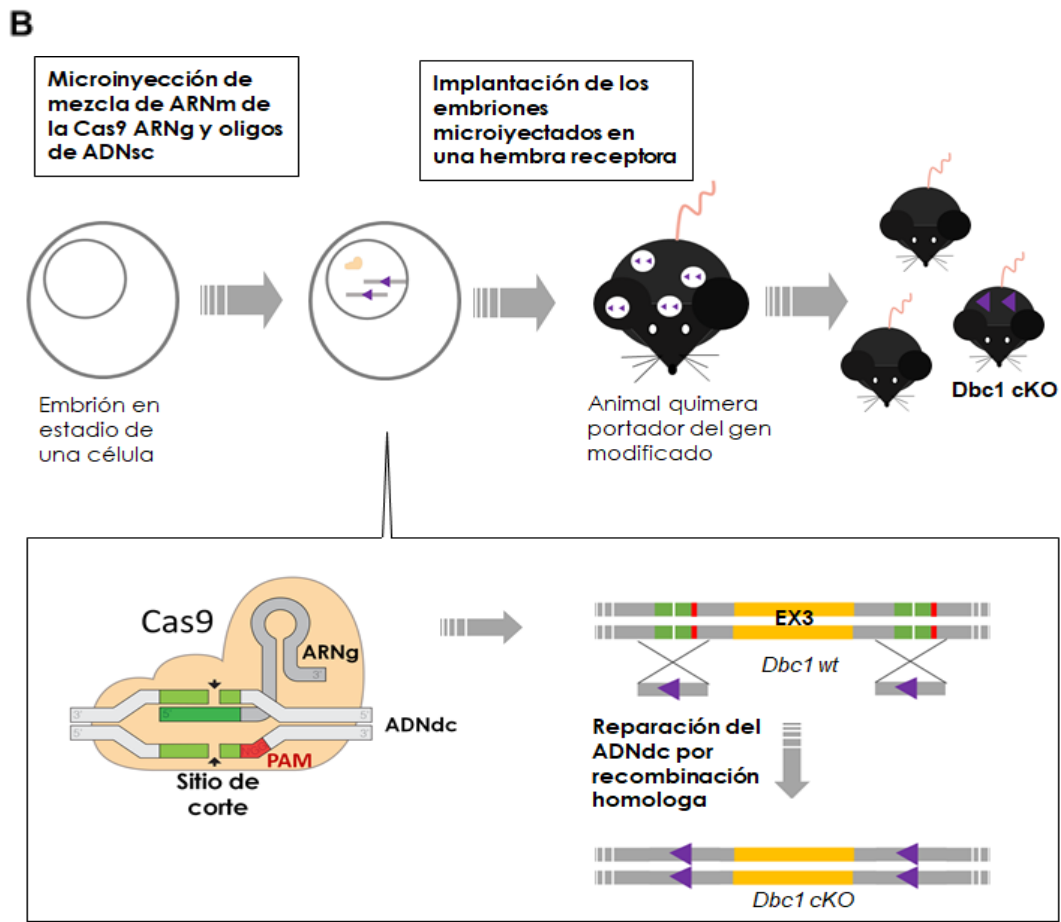
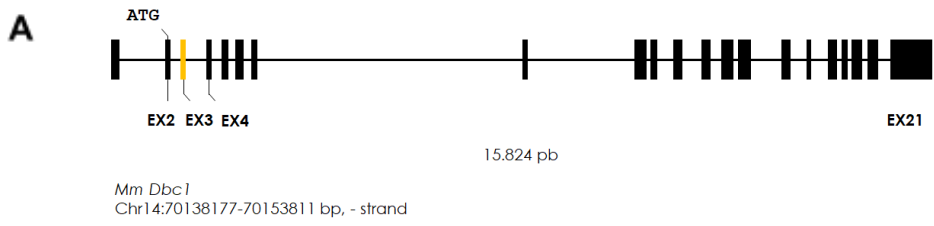


Figura 6.2 Esquemas de la estructura de *Dbc1* y del mecanismo de generación del ratón *Dbc1* cKO. A) Esquema de la estructura de *Dbc1*: se indica el codón de inicio en el exón 2 y en amarillo el exón 3 que es flanqueado por los sitios *loxP* B) Embriones en el estadio de una célula son microinyectados en su núcleo una mezcla de: ARNm de la SpCas9, los ARN guías que dirigen el corte a sitios específicos del intrón 2 y el intrón 3 de *Dbc1*, y los oligonucleótidos de ADN simple cadena que contienen las secuencias *loxP* y brazos con secuencias homólogas a las regiones adyacentes al sitio de corte de la Cas9. Luego del corte en la doble hebra de ADN genómico la maquinaria de reparación del ADN por recombinación homóloga puede utilizar como molde a los oligonucleótidos microinyectados, introduciendo a los sitios *loxP*, sin alterar el resto del gen. Los embriones son transferidos luego de la microinyección a una hembra receptora cuyas crías serán animales quiméricos con solo algunas de las células con genoma editado. Estos animales deben de cruzarse con animales WT esperando que en la descendencia hayan animales portadores del alelo deseado.

El primer criterio se debe a que la enzima Cas9 hidroliza al ADN solo cuando el sitio de corte se encuentra de tres a cuatro nucleótidos corriente arriba de un sitio PAM . Esta secuencia es distinta para las diferentes Cas9. Para el caso de la Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, que es la más utilizada, la secuencia PAM consenso es 5'-NGG-3'¹⁷¹. En cuanto al segundo criterio, es importante que la Cas9 no introduzca cortes en el ADN que ocasionan mutaciones no deseadas.

Para el diseño de las secuencias de los ARNg utilizamos el programa GPP sgRNA Designer de acceso libre disponible en el sitio web del BROAD Institute (portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design). El programa nos sugirió varios ARNg asignándole un score predictivo de su eficiencia.

Intrón 2:

5' GTGCTTAACTCCTTACTGGTTACTCAGAACATGCTCGAGACTCAGTTCAAAAACCTATGGCTCTGGGTGTTTTTCTGAATGTCT
GAGTAGCTGATTGGAGCCACCTAGACCTCTGCGTTTATAAGATCCTCTGGCTATCTTCTAGTGCTTCGGGTAGTAGGTGCAATTCCTGG
AGATTGCTTCTCTGTCCCCATAG 3'

gRNA1: CUUCUAGUGCUUCGGGUAGU Score 92

gRNA2: AUUGGAGCCACCUAGACCUC Score 83

gRNA3: UAUAAACCCAGAGGUCUAGG Score 65

Intrón 3:

5' CTGCTGTGTGTTGTTTCTGTGTTACAATGGTTTTTTGTTGGTTGGTTGGTTTGGTTTTGTCTCTGGTAGTAGGCCAGTGTGGGA
ACGCAGACAACTCTTAGGTTGGGGAATCTTGAATACCTGGCTCCAGAGAGGTCTTGGTGCGGTTTGGATGAAGTCAAGTATTAGCGTCT
GTCCTCTTACAGATAGGCTGTGTGCCCACTGGTTTTCTTCCCATGTGAATTTTCTGTAATACCACGAGCCGA 3'

gRNA4: CGCAGACAACUCUAGGUUG Score 84

gRNA5: CCCAACACUGGCCUACUACC Score 81

gRNA6: AGAGAGGUCUUGGUGCGGUU Score 81

Figura 6.3. Secuencias del intrón 2 del intrón 3 del gen de Dbc1 y de las secuencias para ARNg sugeridos por el GPP sgRNA Designer. En rojo se resaltan las secuencias de los sitios PAM.

Seleccionamos las tres secuencias con mejor score para cada uno de los intrones (las mismas se enseñan en la figura 6.3).

Contando con los oligonucleótidos, nos propusimos en primer lugar comprobar su eficiencia de corte *in vitro*. Para ello generamos en primera instancia una línea de fibroblastos de ratón establemente transfectada para expresar SpCas9 inducida por doxiciclina.

Partimos de células 3T3L1 a las que transfectamos mediante electroporación con un plásmido de expresión Flag-Cas9, que además confería resistencia a la puromicina. Luego del proceso de selección con el antibiótico, las células

resistentes fueron separadas por citometría de flujo para su selección clonal. Seleccionamos los clones que expresaron Cas9, y detectamos su expresión por inmunofluorescencia. En la figura 3.3 se muestra que el clon que seleccionamos para ensayar las guías expresaba Flag-Cas9 de manera homogénea al inducir con 1 $\mu\text{g/ml}$ de doxiciclina.

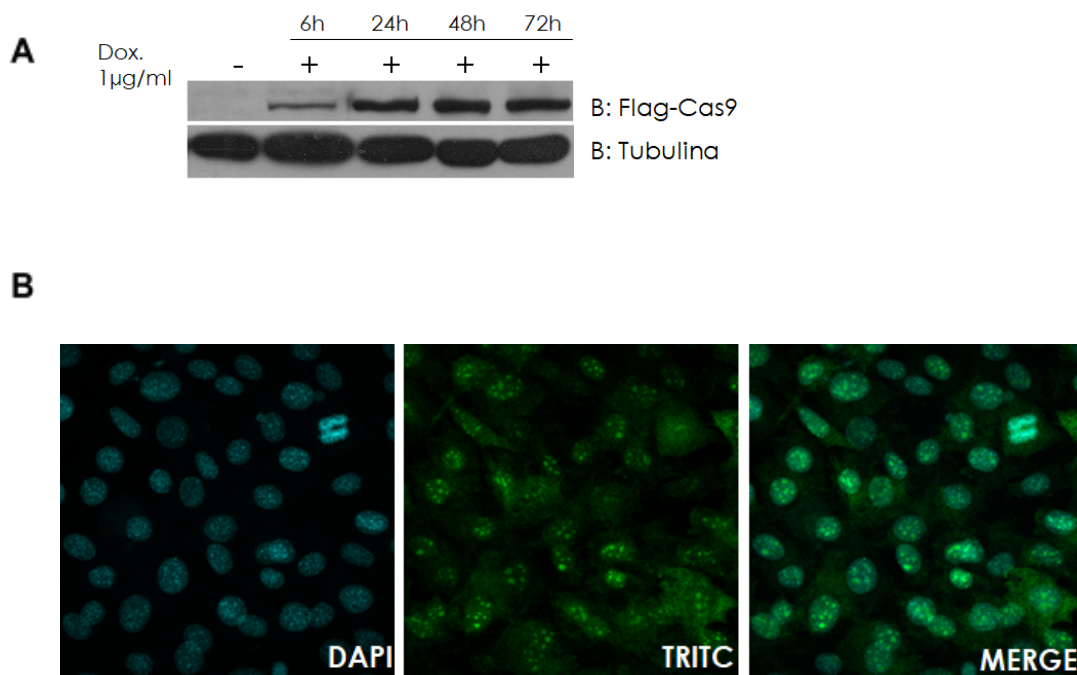


Figura 6.4 Expresión de Flag-Cas9 en células 3T3-Cas9 inducibles (clon 8). En A se muestra un western blot de extractos totales de células a distintos tiempos luego de la incubación con doxiciclina. En B se muestran imágenes de inmunofluorescencia de las células tras 48 h de incubación con doxiciclina.

Observamos la presencia de Cas9 a las seis horas de iniciar la inducción con doxiciclina y al menos hasta las 72h. La enzima recombinante que cuenta con señal de localización nuclear se detectó principalmente dentro del núcleo. De esta forma confirmamos que contamos con una línea estable de células murinas que expresan Cas9.

Una vez que obtuvimos nuestra línea 3T3-Cas9 inducible procedimos a testear los seis ARNg adquiridos de la compañía IDT. Transfectamos nuestras células con cada una de las guías, e indujimos la expresión de Cas9. Luego de 72 h extrajimos ADN genómico, amplificando luego las regiones del intrón 2 y 3 por PCR. Para comprobar la eficacia de las guías nos basamos en un trabajo donde se describe un método de detección de la formación de heteroduplex de ADN en productos de PCR ¹⁷². El método se basa en separar por electroforesis los productos de PCR de la región donde se espera que haya sucedido el corte de la Cas9. Se espera que luego del corte y reparación del ADN, se incorporen mutaciones. Al amplificar la región blanco se amplifican secuencias WT que no han sufrido corte y las distintas secuencias mutantes producto del corte y reparación del ADN. En esta mezcla de secuencias, cuando se desnaturaliza y re naturaliza el ADN amplificado, se forman heteroduplex de distintas secuencias. Los heteroduplex y homoduplex presentan movilidades distintas durante la electroforesis. En la figura 6.5 se representa esquemáticamente el principio de la técnica. En la misma figura, a la derecha, se presentan los resultados que obtuvimos en nuestro testeo de eficacia de los ARNg. Como se puede apreciar, todas la guías fueron eficaces en dirigir el corte de la Cas9 a nuestros sitios de interés. Detectamos la aparición de ADN heteroduplex, y en algunos casos la disminución en la intensidad de la banda correspondiente con el tamaño del amplicón esperado, como se puede ver en los casos de los ARNg 1 y 2. Esta disminución en la eficiencia de la PCR probablemente se deba a la eliminación de tramos de varios pares de bases durante el proceso de reparación luego que sucedió el corte.

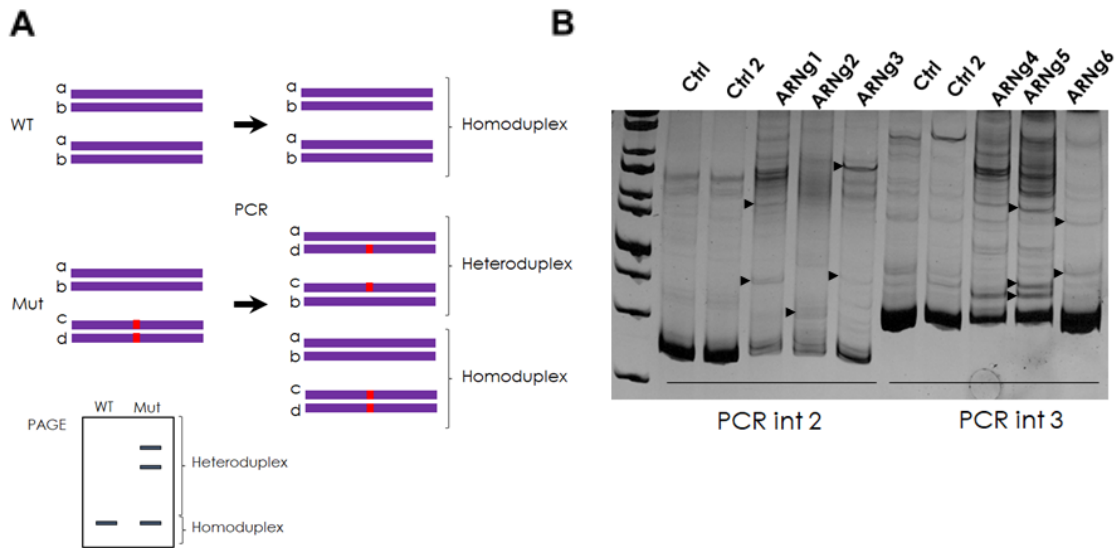
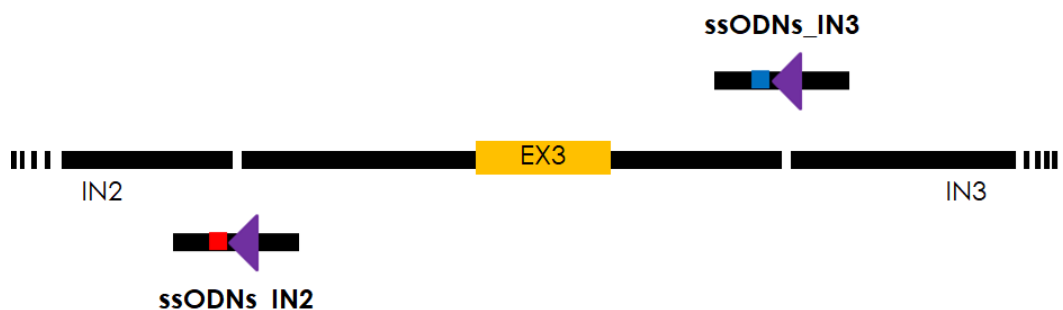


Figura 6.5 Ensayo de eficacia de las guías En A se muestra un esquema descriptivo del principio de la técnica. En B se presenta un gel de electroforesis en acrilamida teñido con EtBr de la corrida de los productos de PCR donde se utilizan como molde ADN genómico de células 3t3-Cas9 luego de haber sido transfectadas con las distintos ARNg y tratadas con doxiciclina. Las flechas negras señalan la formación de heteroduplex que no aparecen en los controles de células sin inducir y sin transfectar e inducidas pero sin transfectar Ctrl y Ctrl2 respectivamente.

En vista de que todas las guías fueron eficientes en generar cortes en ADN en nuestro testeo *in vitro*, decidimos utilizar el ARNg 2 y el ARNg 5 para la generación del ratón.

Además de los ARNg diseñamos oligonucleótidos de ADN simple hebra (ssADN) que servirían de molde para la maquinaria de reparación del ADN por recombinación homóloga. Cada uno de los oligonucleótidos contó con un sitio *loxP* con una misma orientación 5'-3'. También contaban con secuencias de corte de la enzima *NheI* para el oligo molde para el intrón 3 y de la enzima *EcoRI* para el oligo molde del intrón 2. Los sitios de restricción fueron agregados para

poder genotipar e identificar secuencias portadoras de la inserción. En la figura 6.6 se presenta un esquema de los oligonucleótidos moldes que utilizamos.



ssODNs_IN2 :

5' gaagcaatctccaggaattgcacctactacccgaagcactagaagatagccagaggatct
 ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATGAATTCgacattcagaaaaacaccaag
 agccatagtttttgaaactgagtctcgagcatgttctg 3'

ssODNs_IN3 :

5' tccaaaccgcaccaagacctctctggagccaggattcaagattccccaacctagagtt
 ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATGCTAGCcaaaccaaccaaccaaaaa
 aaccattgtaacacaagaaacaacacacagcaggcatc3'

Figura 6.6 Oligonucleótidos de ADN cadena simple moldes para recombinación homóloga

La secuencia *loxP* está marcada en violeta mientras que el sitio de corte para la EcoRI está indicado en rojo y para la NheI en azul.

Para identificar la inserción de los sitios deseados amplificamos por PCR la región que contiene ambos sitios *loxP* y al exón 3. Luego digerimos al producto de PCR con las enzimas de restricción mencionadas. En la figura 6.7 presentamos el resultado esperado con esta técnica de identificación o genotipado de secuencias portadoras de los sitios *loxP*.

Una vez que contamos con los insumos necesarios para generar e identificar a nuestro ratón *Dbc1* cKO intentamos insertar los dos sitios *loxP* en un solo paso. Realizamos las microinyecciones de los ARNg para los dos intrones junto con los respectivos oligonucleótidos de ADN molde en simultáneo buscando introducir los dos sitios *loxP* en una sola ronda de microinyección. En este primer intento se obtuvieron veintitrés crías de las cuales solamente tres dieron positivo en la digestión con *NheI* y ninguna dio positivo en la digestión con *EcoRI*.

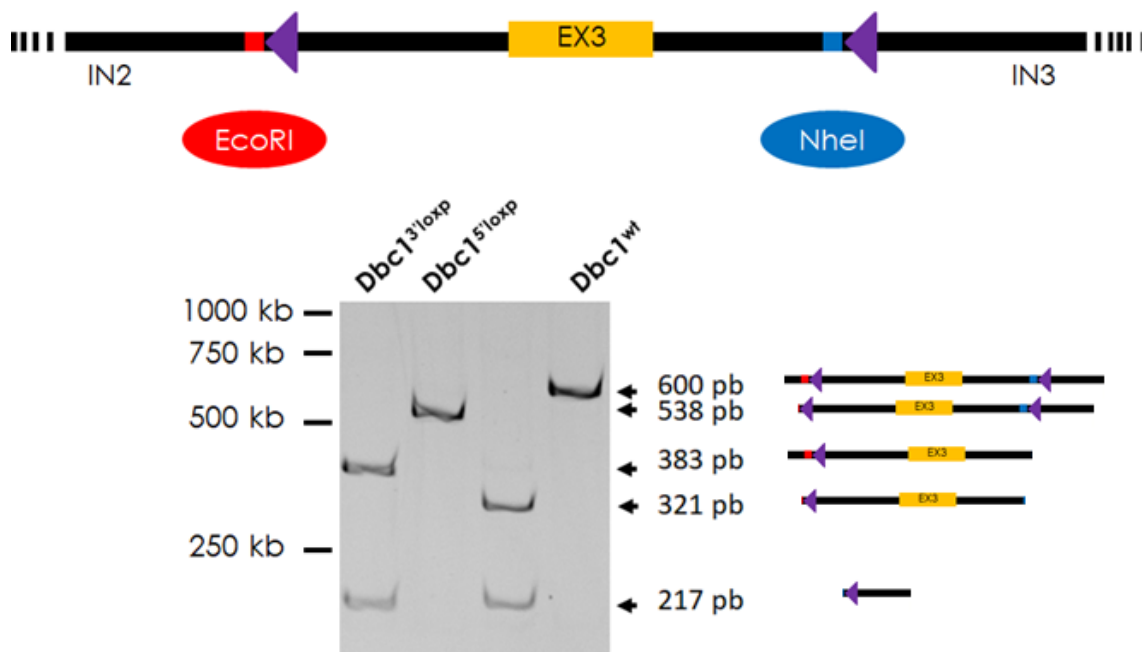


Figura 6.7 Digestiones de productos de PCR con enzimas de restricción Luego de amplificar la región que contiene las secuencias *loxP* y el exón 3, el producto de PCR, un amplicón de 600 pb, es digerido con las enzimas de restricción. En la imagen del gel de acrilamida teñido con BrEt se observa el resultado esperado de la doble digestión con *EcoRI* y *NheI* de la secuencia de *Dbc1* WT o modificada con uno o los dos sitios *loxP*.

En la figura 6.8 podemos ver cómo en algunos casos a pesar de no haber ocurrido recombinación hubo corte de la Cas9. Esto se evidenció por la aparición de heteroduplex en varias de las muestras que no dieron positivas en la digestión con las enzimas de restricción. Para determinar la eficiencia de corte de las guías utilizadas en este experimento realizamos los ensayos de formación de heteroduplex detectando corte por la ARNg 5 en un 56% de los animales mientras que para ARNg 2 solo en un 2%.

Como esperábamos, en los animales que dieron positivo para la digestión se observó una banda producto de la digestión minoritaria en relación a la banda sin digerir. Esto significaba que el animal presentaba el alelo modificado solo en algunas de las células, presentando mosaicismo.

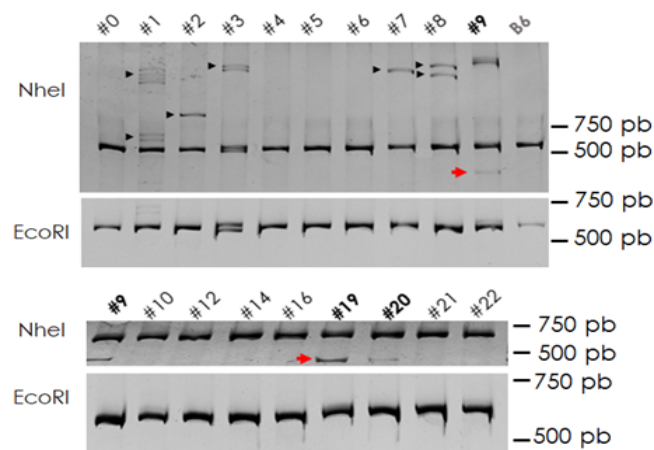


Figura 6.8 Resultados del genotipado de la primer generación de embriones microinyectados Las flechas negras indican los heteroduplex las flechas rojas indican el fragmento generado en la digestión con *NheI* en el ADN proveniente de los animales #9, #19 y #20. También se ven los resultados de la digestión con *EcoRI* los cuales en todos los casos son negativos.

En los productos de PCR de los animales que dieron positivo para la digestión con *NheI* había una mezcla de las secuencias WT y secuencias con el sitio *loxP*.

Para poder secuenciar al alelo modificado clonamos el producto de PCR de 600pb con el sistema pGem t-easy y enviamos varios de los plásmidos clonados a secuenciar. También establecimos cruzamientos entre los animales #9, #19 y #20 con animales C57BL6/J esperando que el alelo modificado sea transferido a su descendencia. De los resultados de secuenciación determinamos que los animales #9 y #19 tenían la modificación que buscábamos mientras que el animal #20 presentaba una secuencia aberrante, posiblemente producto de errores en el proceso de recombinación homóloga durante la reparación de la doble hebra de ADN luego del corte de la Cas9. Por otra parte, de los cruzamientos realizados sólo la descendencia del animal #19 presentó el alelo modificado. De ahora en más nos referiremos a este alelo como *loxP^{3'}*. En la figura 6.9 se muestra el resultado de los genotipados de la descendencia del animal #19 y del cruzamiento entre animales heterocigotas para generar un colonia de animales homocigotas *loxP^{3'}/loxP^{3'}*

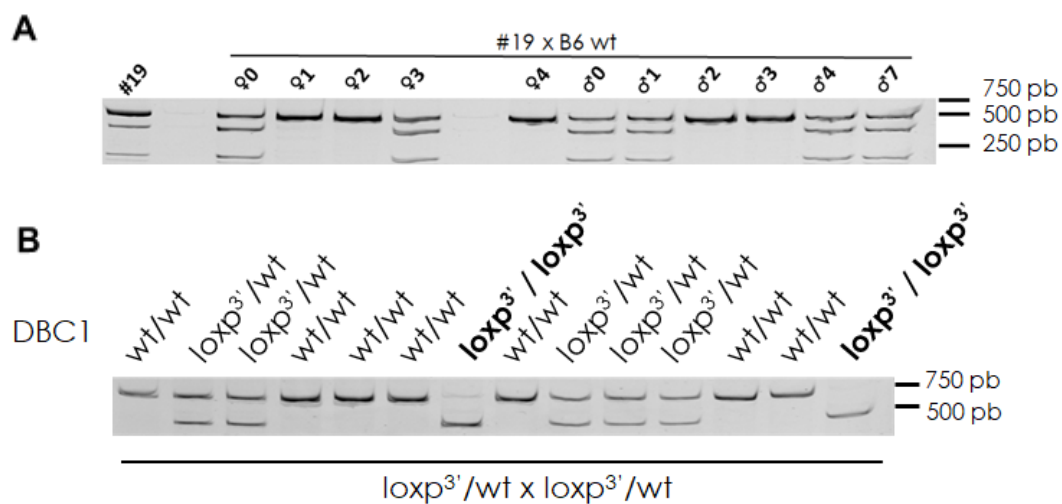


Figura 6.9 Genotipado de los animales que surgieron de los cruzamientos para la obtención de la colonia homocigota para *loxP^{3'}* Se muestra el resultado del genotipado con *NheI* en A se enseña el resultado de genotipado de la descendencia del cruzamiento del

animal #19 obtenido en la primer ronda de microinyección. En B se presenta el genotipado de los animales obtenidos del cruzamiento de animales heterocigotos para para *loxP^{3'}*.

En este contexto decidimos dejar de lado la estrategia de insertar los dos sitios *loxP* en simultáneo e introducir el sitio *loxP* faltante en embriones homocigotas para el *loxP^{3'}*. Antes de eso nos aseguramos que la secuencia donde planeábamos insertar el otro sitio *loxP*, de ahora en más *loxP^{5'}*, no estuviera modificada dejando de ser susceptible al corte de la Cas9 con las guías que ya contábamos en el laboratorio. Como mostramos en la figura 6.10, la región del intrón 2 donde necesitamos insertar el sitio *loxP^{5'}* no presentaba ningún tipo de alteración, lo que nos permitió seguir adelante con el nuevo abordaje.

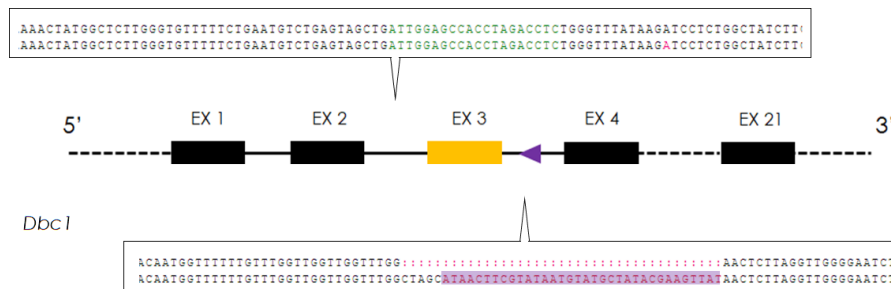


Figura 6.10 Secuencias en las regiones intrónicas 2 y 3 del alelo *loxP^{3'}*. Se muestran cotejadas las secuencias obtenidas del *loxP^{3'}* con la secuencia de referencia para el gen de *Dbc1* wt. En violeta se señala la secuencia del sitio *loxP*. En verde se señala la zona donde se dirigió el corte de la Cas9

También tuvimos en cuenta los resultados de eficiencia para las guías que utilizamos en la primera ronda de microinyección. Dada la baja eficiencia de el

ARNg 2, cambiamos la guía para introducir el corte en el intrón 2, y comenzamos a utilizar a la ARNg 3.

En estrecha colaboración con la UATE (Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación del Institut Pasteur Montevideo) optimizamos la producción de embriones para fertilización *in-vitro*. Utilizamos hembras y machos loxP³, y se obtuvieron cigotos que luego microinyectamos con la mezcla de CRISPR. En esta ocasión obtuvimos 22 crías de las cuales ninguna presentó el genotipo deseado.

Entonces decidimos hacer un nuevo intento cambiando esta vez el proveedor del ARN guía. La empresa Synhtego ofrece ARN guías que en los tres nucleótidos de ambos extremos cuentan con 2'-O-metilaciones y 3' fosforotioatos. Se ha reportado que esta modificación aumenta la eficiencia de la Cas9 en el corte ¹⁷³. En esta oportunidad, utilizando el nuevo ARNg, tuvimos éxito con la inserción del sitio *loxP* como se muestra en la figura 6.11.

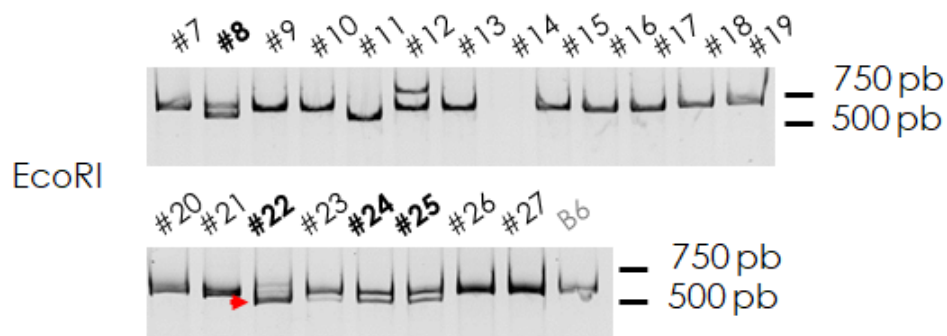


Figura 6.11 Genotipado de los animales generados en el último intento de generación. Se muestran los resultados del genotipado por digestión del producto de PCR de 600pb con la enzima *EcoRI*. Se puede apreciar como los animales #8, 22# #24 y #25 dieron positivos para el loxP⁵

La hembra #22 fue la que evidenció una mayor presencia de la secuencia *loxP*^{5'} según el resultado de las digestiones con *EcoRI*. Cruzamos entonces a la hembra #22 con un macho C57BL/6/J y en la descendencia constatamos que el alelo *loxP*^{5'} se había transferido. Realizamos entonces las retrocruzas necesarias para la obtención de una colonia de animales homocigotas para el alelo cKO de *Dbc1* o *loxP*^{5'-3'}. En la figura 6.12 mostramos el resultado del genotipado de animales *loxP*^{5'-3'}.

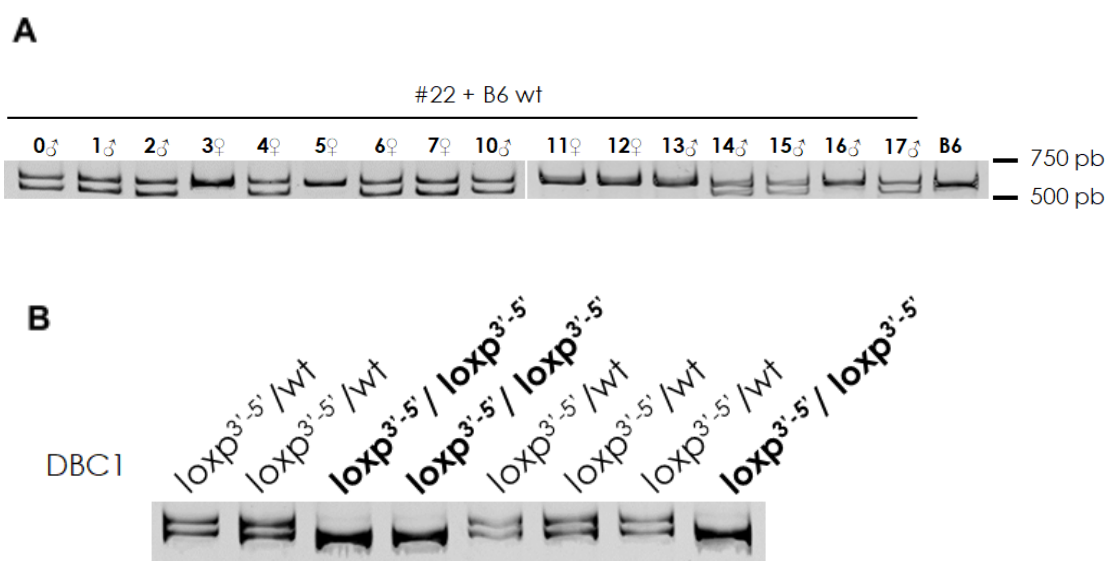


Figura 6.12 Genotipado de los animales que surgieron de los cruzamientos para la obtención de la colonia homocigota para *loxP*^{3'-5'}. Se muestra el resultado del genotipado con *EcoRI*. En A se enseña el genotipado de la descendencia del cruzamiento del animal #22 obtenido en la última ronda de microinyección. En B se presenta el genotipado de los animales obtenidos del cruzamiento de animales heterocigotos para *loxP*^{3'-5'}.

Secuenciamos verificando que no hubiera alteraciones en la secuencia más allá de los dos sitios *loxP* insertados con sus respectivos sitios de corte para enzima de restricción (Fig. 6.13).

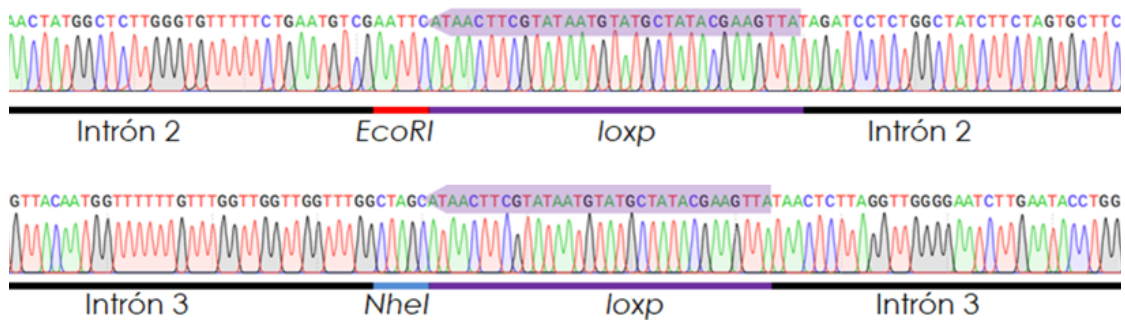


Figura 3.12 Resultados de secuenciado de la región modificada Se presentan los gráficos de los resultados de secuenciamiento de las regiones donde se introdujeron los sitios *loxP* en los intrones dos y tres.

Para confirmar si la inserción de la secuencia *loxP* en los sitios que elegimos, efectivamente inactiva la expresión de *Dbc1*, realizamos experimentos *in-vitro* a partir de fibroblastos embrionarios de ratones *Dbc1* cKO (MEFs *Dbc1* cKO). Transfectamos las MEFs con un vector de expresión de la recombinasa CRE y de la proteína fluorescente GFP como reportero. Separamos las células GFP positivas por citometría de flujo y las crecimos durante 72h. De estas células cosechamos una parte para extracción de ADN y otra parte para western blot. En 6.14B se ve cómo el amplicón esperado para la secuencia WT y para las MEFs GFP negativas migró a una altura de 600 pb, en tanto para la muestra de ADN obtenida de MEF GFP positivas el producto de PCR migró a la altura de las 300 pb. Esto indica claramente que la región flanqueada por los sitios *loxP* se elimina en presencia de la proteína CRE recombinante.

A nivel de la expresión de la proteína, observamos con claridad que tanto en los lisados de células control como en los lisados de células transfectadas GFP negativas la proteína *Dbc1* está presente pero en el caso de las células MEF GFP positivas la presencia de *Dbc1* no es detectable (Fig. 6.14C).

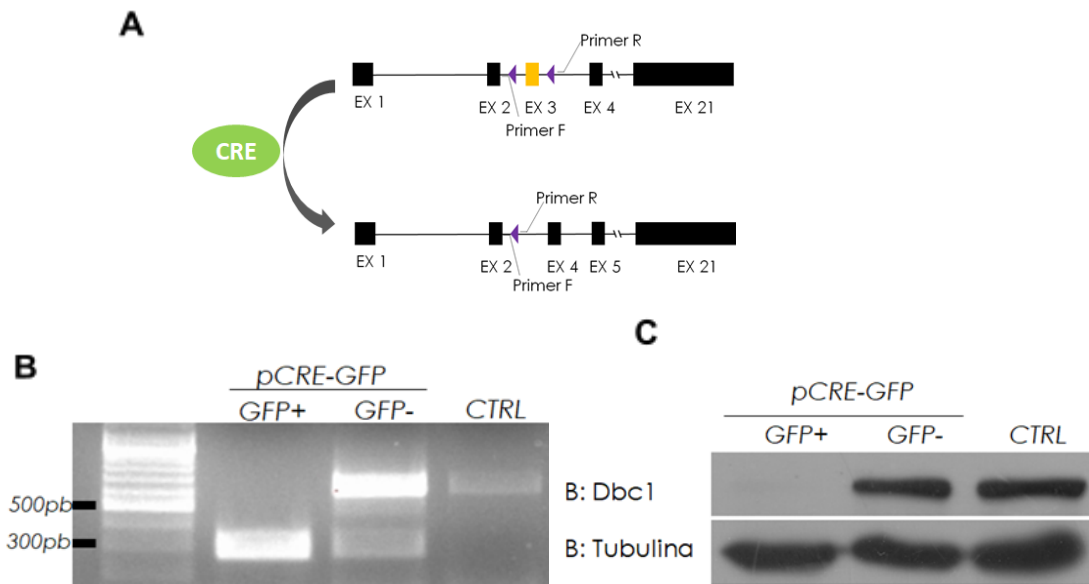


Figura 6.14 Confirmación de que el sistema cre/loxP funciona en nuestro modelo. En A se presenta un diagrama de nuestra construcción antes y después del accionar de la cre. También están señalados los sitios donde se unen los *primers* que se utilizaron para la PCR. En B muestro el resultado de la PCR utilizando como molde ADN genómico extraído de las MEF. En C se puede ver el resultado del WB

Noqueo de Dbc1 in-vivo en adipocitos

La primera pregunta que nos propusimos responder utilizando el ratón condicional es si la obesidad saludable que manifiestan los *Dbc1* KO se debe a que cuentan con un tejido adiposo con mayor capacidad expansiva o si esto es simplemente el reflejo de un mejor estatus metabólico a nivel sistémico. Para esto decidimos noquear la expresión de DBC1 en adipocitos maduros.

Como objetivo de esta tesis nos propusimos la generación del modelo *Dbc1* cKO. Las preguntas biológicas que pretendemos responder utilizando esta

herramienta no fueron abordadas en el transcurso de este trabajo. Lo que hicimos aquí fue evaluar la capacidad que tiene nuestro modelo de eliminar la expresión de *Dbc1* en adipocitos lo que será de gran relevancia para trabajos futuros del laboratorio.

Evaluamos dos modelos de ratón que obtuvimos del repositorio Jackson Laboratory para la inducción del noqueo en adipocitos: un modelo que permite el control temporal del noqueo y otro que produce el noqueo constitutivo de la proteína.

El primer animal que evaluamos fue el transgénico *Adipoq-cre/ERT2*. Este animal expresa la recombinasa CRE-ERT2 bajo el dominio del promotor de adiponectina, esto permite la inducción del noqueo en adipocitos maduros (blancos y marrones) que van a expresar de manera constitutiva a la CRE ¹⁷⁴. Estos sistemas expresan una proteína quimérica que fusiona a la recombinasa CRE junto con el dominio del receptor de estrógenos humano mutado que se une específicamente a 4 hidroxitamoxifeno ¹⁷⁵. De esta manera se puede regular temporalmente la inducción del noqueo administrando tamoxifeno a los animales. Para la inducción del noqueo nos basamos en los protocolos de inducción previamente reportados por otros ^{174,176,177}.

Como mostramos en la figura 6.15 la administración de tamoxifeno (TAM) indujo la recombinación de *Dbc1* cuando analizamos el ADNg de tejido adiposo blanco. La recombinación sólo sucede en los animales administrados con tamoxifeno lo que indica que la inducción de la recombinación es dependiente de la presencia del TAM y que no hay translocación al núcleo de la recombinasa en ausencia de la droga. Como control analizamos el ADNg del hígado de los animales administrados donde no detectamos recombinación (Fig 6.15).

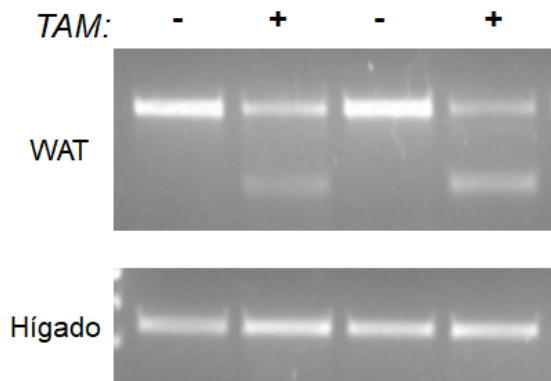


Figura 6.15 Recombinación del ADNg en tejido adiposo blanco de animales administrados con tamoxifeno. Se presenta el resultado de la PCR para la región del *Dbc1* que contiene al exón 3. Para las PCRs se utilizó el molde, ADNg purificado de tejido adiposo blanco (WAT) e hígado.

Cuando analizamos los niveles de proteína observamos una disminución en la expresión de *Dbc1* en tejido adiposo blanco de un 70% en animales portadores de la CRE y administrados con TAM (Fig 6.16)

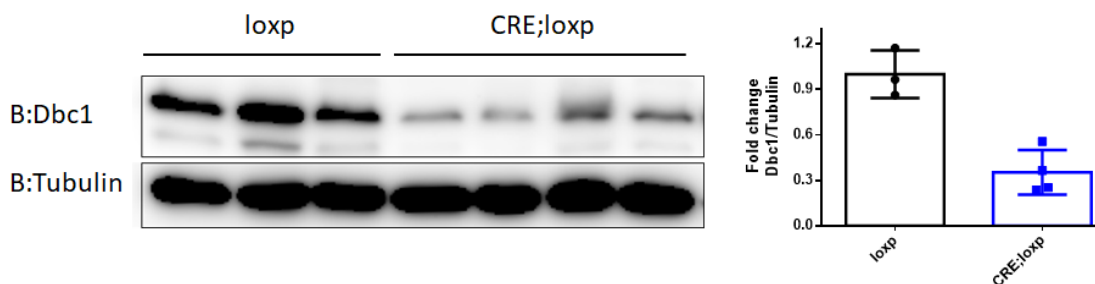


Figura 6.16 Inducción del noqueo a nivel de proteína. Resultados de western blot para extractos proteicos de tejido adiposo blanco de animales *Dbc1 loxP/loxP;cre* y *Dbc1 loxP/loxP* administrados con tamoxifeno.

También detectamos la disminución de los niveles de *Dbc1* en tejido adiposo marrón pero no vimos afectados los niveles de la proteína en el tejido en el hígado como se muestra en la figura 6.17

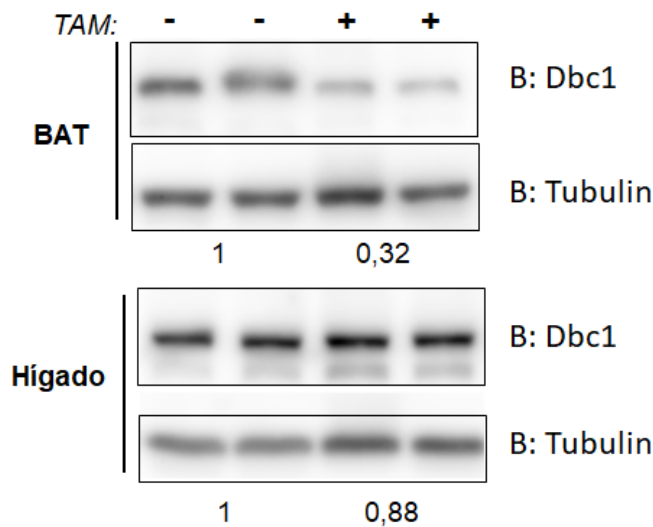


Figura 6.17 Inducción del noqueo a nivel de proteína en tejido adiposo marrón. Resultados de western blot para extractos proteicos de tejido adiposo marrón e hígado de animales *Dbc1 loxP/loxP;cre* y *Dbc1 loxP/loxP* administrados con tamoxifeno.

También vimos que la disminución en los niveles de proteína en el tejido adiposo marrón se correlaciona a la recombinación que observamos cuando analizamos el ADNg del tejido (Fig. 6.18).

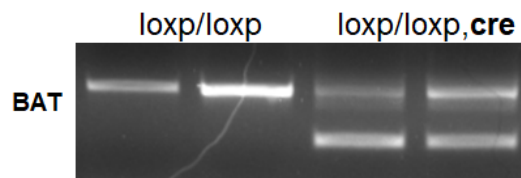


Figura 6.18 Recombinación del ADNg en tejido adiposo marrón de animales administrados con tamoxifeno. Se presenta el resultado de la PCR para la región del *Dbc1* que contiene al exón 3. Para las PCRs se utilizó el molde, ADNg purificado de tejido adiposo marrón.

Como podemos apreciar en estos resultados los niveles de recombinación y de noqueo de la proteína son parciales cuando analizamos extractos de tejido total. Debemos considerar que a pesar que los adipocitos son las células que mayoritariamente componen el tejido adiposo, los otros tipos celulares también expresan *Dbc1*. Por este motivo decimos fraccionar al tejido adiposo separando

adipocitos de la fracción estromal vascular, compuesta por células del tejido conjuntivo, células vasculares y células del sistema inmune. Al analizar los niveles de recombinación en las distintas fracciones de tejido adiposo comprobamos que la inducción de la recombinación en los adipocitos tenía una eficiencia del 50% (Fig. 6.19).

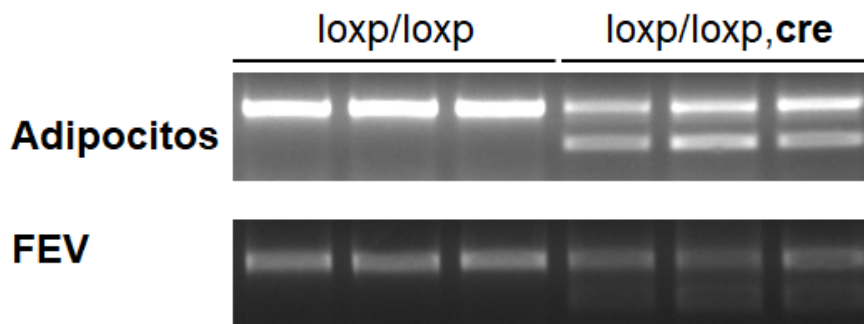


Figura 6.19 Recombinación del ADNg en adipocitos y fracción estromal vascular. Se presenta el resultado de la PCR para la región del *Dbc1* que contiene al exón 3. Para las PCRs se utilizó el molde, ADNg purificado de adipocitos y fracción estromal vascular

El otro animal que evaluamos fue el BS.FVB-Tg(*Adipoq-cre*) 1Evdr/J. Al igual que el inducible este expresa la recombinasa CRE en adipocitos maduros, pero no es necesario administrar tamoxifeno para que ocurra la recombinación de un gen floxeado.

En esta oportunidad logramos observar de forma clara el noqueo de *Dbc1* en los adipocitos maduros. En la figura 6.20 se ve el resultado de western blot de la expresión de la proteína *Dbc1* en distintos tejidos y en adipocitos y fracción estromal vascular de animales *Dbc1* cKO;*Adipo-CRE* y *Dbc1* cKO. Observamos que *Dbc1* se expresaba de manera similar en la fracción estromal vascular, hígado y cerebro de los dos genotipos. El noqueo fue total en los adipocitos de los animales que expresan a la recombinasa. En tejido adiposo marrón y blanco

detectamos una menor expresión de Dbc1 en los animales que expresan a la recombinasa.

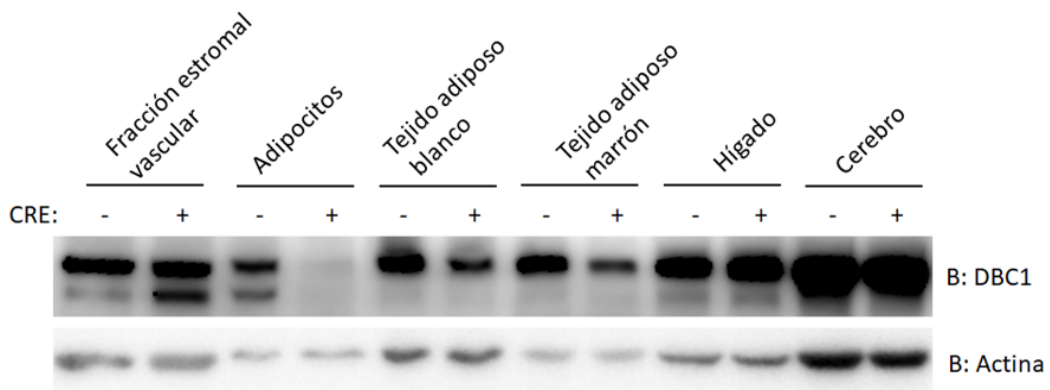


Figura 6.20 Expresión de la proteína Dbc1 en distintos tejidos Resultados de western blot de la expresión de Dbc1 en distintos tejidos de ratones que expresan y que no expresan a la recombinasa CRE bajo el dominio del promotor del gen de la adiponectina.

6.2 Discusión

En el desarrollo de la generación de nuestro ratón condicional pusimos a punto técnicas para evaluar la eficiencia de ARN guías para el sistema CRISPR/Cas9. La generación de la línea de fibroblastos Cas9 inducible tuvo para nuestro caso la utilidad de evaluar a los ARN guía pero es también una herramienta de utilidad para la implementación de CRISPR en otros estudios *in-vitro*.

Una vez seleccionadas las guías, nos propusimos como estrategia inicial, insertar en simultáneo los dos sitios *loxP* necesarios para generar el alelo condicional en una sola ronda de micromanipulación. Esto no funcionó como esperábamos y debimos de realizar varias rondas de micromanipulación de los embriones para obtener la construcción deseada.

A pesar de que los recursos informáticos disponibles permiten predecir de forma eficiente la capacidad de las guías para dirigir el corte y de haber confirmado que las guías que diseñamos funcionaban en un contexto *in-vitro*, en el proceso de edición de los embriones no tuvimos los resultados esperados. Observamos que la guía seleccionada para introducir cortes en el intrón 3 funcionó correctamente generando cortes en el ADN que se hacen evidentes por la formación de heteroduplex al genotipar los animales. La reparación por recombinación homóloga, luego de producido el corte de la doble hebra de ADN por la Cas9, es el mecanismo menos frecuente de reparación. En nuestro caso, a pesar de haberse producido varios eventos de corte en el intrón 3, solo 3 de 22 animales presentaron la inserción esperada en ese intron. Para el caso de la guía empleada para introducir la modificación en el intrón 2 el resultado del genotipado de la primera generación mostró que la Cas9 introduce cortes en el ADN con una frecuencia muy baja según pudimos determinar en un ensayo de

detección de heteroduplex. Logramos resolver este problema de eficiencia utilizando ARNg con la misma secuencias pero utilizando ARNg con bases 2'O-metiladas en los extremos y enlaces fosforotioato. Esto sugiere que la baja eficiencia en el corte se estaba dando por un problema de estabilidad de ARNg y no por un problema de secuencia.

Verificamos mediante la secuenciación de las regiones donde se introdujeron los sitios *loxP* y el entorno de las mismas, que nuestra manipulación solo introdujo las modificaciones que esperábamos. También corroboramos a nivel funcional el noqueo, observando tanto a nivel de ADN la recombinación por la CRE, así como a nivel de proteína por western blot. Podemos afirmar que la construcción funciona de manera adecuada ante la inducción del noqueo de la expresión de DBC1.

Ensayamos también *in-vivo* la capacidad de noquear a DBC1 cruzando a nuestro ratón con un ratón CRE inducible por tamoxifeno en adipocitos. Comprobamos que la inducción del noqueo es específica en tejido adiposo, y que la expresión de la proteína no se ve afectada, al menos en el hígado, que tomamos como referencia de tejidos periféricos. En cuanto a la eficiencia de noqueo logramos una eficiencia máxima de noqueo de entre un 50-70%, medido a nivel de ADN genómico y a nivel de expresión de la proteína. En el fraccionamiento de adipocitos y fracción estromal vascular puede ser que estemos detectando ADN contaminante proveniente de otras células que se dañan durante el procesos de digestión del tejido adiposo. Esto podría ser un factor que nos esté haciendo subestimar la eficacia de la recombinación. Cuando medimos el noqueo a nivel del tejido completo mirando los niveles de proteína, quizás la contribución en la expresión de DBC1 por la fracción no adipocitaria sea la principal responsable de la expresión de la proteína. A pesar de que el animal *AdipQ CreER* ha sido utilizado con éxito por otros grupos utilizando protocolos de inducción

similares a los nuestros, está reportado que el uso de tamoxifeno no es el más adecuado para inducir el noqueo en tejido adiposo, debido al efecto lipodistrófico que puede genera la droga^{177,178}. Quizás lo que está sucediendo en nuestro sistema es que el tamoxifeno está dañando al tejido adiposo y en la recuperación del mismo los nuevos adipocitos siguen expresando a la proteína. De todas maneras el noqueo parcial que nosotros obtuvimos no será suficiente para los estudios que nos interesan llevar a cabo a nivel de metabolismo y la función de DBC1 en tejido adiposo.

Finalmente utilizando un animal que expresa la recombinasa no inducible logramos con éxito el noqueo *in-vivo* de DBC1 de manera específica en los adipocitos.

7. Conclusiones generales

En esta sección realizaremos un punteo a modo de síntesis de las conclusiones generales que se desprenden de nuestro trabajo.

- En este trabajo describimos un nuevo nivel de regulación de la proteína DBC1 dependiente del estado proliferativo de la célula. Encontramos que en células quiescentes con capacidad de reingresar al ciclo celular, DBC1 disminuye su expresión a expensas de la aparición de una forma truncada de la proteína, que dimos en llamar DN-DBC1. A la vez encontramos que la forma DN-DBC1 es inmediatamente reemplazada por DBC1 cuando la célula vuelve a ingresar al ciclo celular.
- La aparición de DN-DBC1 implica la modificación postraduccional de DBC1 en la cual la proteína pierde un fragmento en el entorno de los 124 a 138 aminoácidos en su extremo amino terminal. La proteólisis parcial de la proteína está mediada por un mecanismo en el que participa el proteosoma.
- La forma DN-DBC1 no tiene la capacidad de unirse a SIRT1, aún contando con la región donde se propuso originalmente que ocurre la interacción DBC1-SIRT1. Por lo tanto DN-DBC1 no es capaz de inhibir la actividad de SIRT1 como si lo hace DBC1. Esto explica el aumento en la actividad SIRT1 durante la quiescencia y su actividad disminuida cuando la célula se encuentra proliferante. De modo que este trabajo presenta una nueva forma en la regulación de la actividad de SIRT1 mediada por DBC1.
- Exploramos la capacidad de formación de multímeros por parte de las formas DBC1 y DN-DBC1. Confirmamos que DBC1 puede estar formando complejos consigo misma e incorporar en estos complejos a la forma DN-DBC1, y lo mismo sucede con DN-DBC1. Aparentemente

estos complejos presentan distintos grados de afinidad, lo que sugiere que podrían tener una función diferencial.

- Pudimos detectar la presencia de DN-DBC1 en distintos tejidos tanto de ratones como humanos. También observamos cómo sus niveles de expresión son diferentes en distintas fracciones del tejido adiposo lo que podría vincularse a la capacidad proliferativa de las células en esta fracción. Así también deja abierta la posibilidad de que el mantenimiento de la regulación de DBC1 sea un determinante en la capacidad expansiva del tejido adiposo.
- Identificamos a DBC1 como una proteína importante para que el ciclo celular transcurra con normalidad en células no transformadas. Esto se ve reflejado en las alteraciones presentes durante el proceso de regeneración hepática en los animales *Dbc1* KO. La relación DBC1/DN-DBC1 es regulada dinámicamente durante la progresión de la regeneración hepática. En los animales *Dbc1* KO el proceso de regeneración presenta alteraciones a nivel del ciclo presentando un enlentecimiento en la transición G₂/M.
- Identificamos varias proteínas secretadas por la célula que nos aproximan a comprender los fenotipos observados en el modelo *Dbc1* KO. Encontramos que en cultivos primarios de células provenientes de animales *Dbc1* KO, disminuye la secreción de factores que participan en la regulación del metabolismo lipídico, la inflamación, y la sensibilidad a la insulina. También encontramos cambios en los niveles de secreción de proteínas asociadas a la aparición de lesiones vasculares a las que los animales *Dbc1* KO son más susceptibles.
- Determinamos que la secreción de la proteína Fstl1 es regulada por *Dbc1* en el tejido adiposo en un mecanismo mediado por Sirt1. Esta regulación parece de gran relevancia teniendo en cuenta las funciones que Fstl1

cumple en la diferenciación del tejido adiposo y el posible efecto beneficioso que se le adjudica a Fstl1 a nivel cardíaco.

- Generamos un ratón *Dbc1* cKO, utilizando CRISPR Cas9 para edición génica del gen *Dbc1*. En el transcurso de la obtención de este nuevo modelo, pusimos a punto herramientas que permiten evaluar la eficiencia de ARN guías para CRISPR. Confirmamos por secuenciación que la construcción fue un éxito y funcionalmente que DBC1 se noquea eficientemente en presencia de la recombinasa CRE. Nuestro animal *Dbc1* cKO será de gran utilidad para seguir profundizando en comprender el rol de la proteína *in-vivo*.
- Logramos el *noqueo* parcial de DBC1 en el tejido adiposo utilizando un modelo inducible con tamoxifeno. Pusimos a punto un protocolo de administración que permite disminuir la expresión de DBC1 en el tejido adiposo entre un 50 -70%.
- Alcanzamos a noquear completamente la expresión de DBC1 en adipocitos de ratón y constatamos la disminución de la expresión de la proteína en el tejido adiposo blanco y marrón.

8. Perspectivas

En esta sección presentaremos algunos de los aspectos hacia donde se podría orientar el trabajo futuro en función de los datos y conclusiones obtenidos en esta tesis de doctorado.

- Profundizar en la comprensión de las funciones moleculares de la proteína DN-DBC1 y entender si es una forma inactiva de DBC1 o si la modificación proteolítica le confiere una ganancia de funciones. DN-DBC1 no cuenta con la región donde se ha propuesto que interaccionan la mayor parte de los blancos moleculares de DBC1. Es necesario estudiar si DN-DBC1 conserva su capacidad de interaccionar con el resto de sus interactores y las implicancias que esto tiene durante la quiescencia. Determinar la capacidad de la DN-DBC1 recombinante de unir a proteínas como p53, PARP1 y Rev-erba recombinantes, en células en cultivo sería un primer paso en este sentido así como evaluar la interacción entre las distintas proteínas en experimentos de coimmunoprecipitación.
- Otro aspecto importante sobre la regulación de la dinámica DBC1/DN-DBC1 que se debe profundizar, es en la identificación de cuáles residuos o modificaciones postraduccionales dirigen a DBC1 a su procesamiento proteolítico. Nosotros encontramos que el proteosoma participa en el procesamiento. En este trabajo sustituimos cuatro lisinas que se han encontrado ubiquitinadas en otros trabajos. Estas cuatro lisinas se encuentran en el entorno de donde mapeamos el sitio de corte en DBC1. Estas sustituciones no lograron impedir la aparición de DN-DBC1. Aún así la proteína cuenta con dos lisinas más en ese entorno que no fueron modificadas y que podrían ser susceptibles a ser ubiquitinadas. Será interesante, y de hecho es intención de nuestro grupo

hacerlo, reemplazar por argininas a las dos lisinas restantes y verificar si se produce el corte. Igualmente no descartamos la posibilidad de que el mecanismo de corte sea independiente de la ubiquitina, por lo cual sería interesante investigar si existen otras modificaciones postraduccionales que puedan regular el corte mediante espectrometría de masas.

- Nuestro grupo a su vez está interesado en trasladar lo que hoy sabemos sobre la biología de DBC1 a partir de los modelos animales hacia la clínica. Principalmente queremos estudiar la relevancia que tiene la dinámica de expresión de DN-DBC1/DBC1 en la fisiología del tejido adiposo de pacientes obesos, y su vínculo con la obesidad metabólicamente saludable y los trastornos del metabolismo. En este sentido en un convenio marco entre el Instituto Pasteur y el Hospital Maciel se tendrá acceso a tejido adiposo de pacientes obesos sometidos a cirugía bariátricas. Los datos clínicos de estos pacientes indican que un 10% presentan obesidad metabólicamente saludable. Se analizará la expresión de DN-DBC1 en el tejido adiposo y en sus fracciones y cruzaremos nuestros datos con los datos clínicos de los pacientes.
- Será importante confirmar que las proteínas secretadas reguladas por DBC1 que identificamos en nuestro experimentos *in-vitro* son también secretadas por el tejido adiposo. En el futuro se estudiarán los perfiles de proteínas secretadas por explantos de tejido adiposo de animales WT y KO. A su vez se medirán por ELISA los niveles de las proteínas en plasma de los animales KO y los animales cKO donde se encuentre noqueada DBC1 en los adipocitos.
- Por último con la finalidad de confirmar el aporte del tejido adiposo en la obesidad saludable que presentan los ratones KO será importante estudiar el fenotipo de los ratones *Dbc1* cKO;*CRE-AdipoQ* al ser alimentados con dieta obesogénicas y así determinar cuál es el rol de

DBC1 en los adipocitos en la protección metabólica. Con este fin se deben analizar parámetros metabólicos como son la glucemia, los niveles de insulina y de factores proinflamatorios en los animales obesos que no expresan DBC1 en sus adipocitos.

9. Bibliografía

1. Hamaguchi, M. *et al.* DBC2, a candidate for a tumor suppressor gene involved in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 13647–13652 (2002).
2. Johnson, G. S., Rajendran, P. & Dashwood, R. H. CCAR1 and CCAR2 as gene chameleons with antagonistic duality: Preclinical, human translational, and mechanistic basis. *Cancer Sci.* **111**, 3416–3425 (2020).
3. Brunquell, J., Yuan, J., Erwin, A., Westerheide, S. D. & Xue, B. DBC1/CCAR2 and CCAR1 Are Largely Disordered Proteins that Have Evolved from One Common Ancestor. *BioMed Res. Int.* **2014**, 418458 (2014).
4. Magni, M. *et al.* CCAR2/DBC1 is required for Chk2-dependent KAP1 phosphorylation and repair of DNA damage. *Oncotarget* **6**, 17817–17831 (2015).
5. Li, J. *et al.* A conserved NAD⁺ binding pocket that regulates protein-protein interactions during aging. *Science* **355**, 1312–1317 (2017).
6. Escande, C. *et al.* Deleted in Breast Cancer 1 regulates cellular senescence during obesity. *Aging Cell* **13**, 951–953 (2014).
7. DBC1 functions as a tumor suppressor by regulating p53 stability - PubMed.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25732823/>.
8. DBC1 Regulates p53 Stability via Inhibition of CBP-Dependent p53 Polyubiquitination - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30893604/>.
9. Close, P. *et al.* DBIRD complex integrates alternative mRNA splicing with RNA polymerase II transcript elongation. *Nature* **484**, 386–389 (2012).
10. Chini, C. C. S., Escande, C., Nin, V. & Chini, E. N. DBC1 (Deleted in Breast Cancer 1) modulates the stability and function of the nuclear receptor Rev-erba. *Biochem. J.* **451**, 453–461 (2013).
11. Chini, C. C. S., Escande, C., Nin, V. & Chini, E. N. HDAC3 Is Negatively Regulated by the

- Nuclear Protein DBC1. *J. Biol. Chem.* **285**, 40830–40837 (2010).
12. Kim, J.-E., Chen, J. & Lou, Z. DBC1 is a negative regulator of SIRT1. *Nature* **451**, 583–586 (2008).
 13. Zhao, W. *et al.* Negative regulation of the deacetylase SIRT1 by DBC1. *Nature* **451**, 587–590 (2008).
 14. Hiraike, H. *et al.* Identification of DBC1 as a transcriptional repressor for BRCA1. *Br. J. Cancer* **102**, 1061–1067 (2010).
 15. Fu, J. *et al.* Deleted in Breast Cancer 1, a Novel Androgen Receptor (AR) Coactivator That Promotes AR DNA-binding Activity. *J. Biol. Chem.* **284**, 6832–6840 (2009).
 16. Yu, E. J. *et al.* Reciprocal roles of DBC1 and SIRT1 in regulating estrogen receptor α activity and co-activator synergy. *Nucleic Acids Res.* **39**, 6932–6943 (2011).
 17. Trauernicht, A. M., Kim, S. J., Kim, N. H. & Boyer, T. G. Modulation of estrogen receptor alpha protein level and survival function by DBC-1. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **21**, 1526–1536 (2007).
 18. Li, Z. *et al.* Inhibition of SUV39H1 methyltransferase activity by DBC1. *J. Biol. Chem.* **284**, 10361–10366 (2009).
 19. Anantharaman, V. & Aravind, L. Analysis of DBC1 and its homologs suggests a potential mechanism for regulation of sirtuin domain deacetylases by NAD metabolites. *Cell Cycle Georget. Tex* **7**, 1467–1472 (2008).
 20. Uversky, V. N. Intrinsically Disordered Proteins and Their “Mysterious” (Meta)Physics. *Front. Phys.* **7**, (2019).
 21. Li, C. *et al.* The role of lncRNA MALAT1 in the regulation of hepatocyte proliferation during liver regeneration. *Int. J. Mol. Med.* **39**, 347–356 (2017).
 22. Chen, R. *et al.* Quantitative proteomics reveals that long non-coding RNA MALAT1 interacts with DBC1 to regulate p53 acetylation. *Nucleic Acids Res.* **45**, 9947–9959 (2017).

23. Nin, V., Chini, C. C. S., Escande, C., Capellini, V. & Chini, E. N. Deleted in breast cancer 1 (DBC1) protein regulates hepatic gluconeogenesis. *J. Biol. Chem.* **289**, 5518–5527 (2014).
24. Zheng, H. *et al.* hMOF acetylation of DBC1/CCAR2 prevents binding and inhibition of SirT1. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 4960–4970 (2013).
25. Yuan, J., Luo, K., Liu, T. & Lou, Z. Regulation of SIRT1 activity by genotoxic stress. *Genes Dev.* **26**, 791–796 (2012).
26. Lee, J., Adelmant, G., Marto, J. A. & Lee, D.-H. Dephosphorylation of DBC1 by Protein Phosphatase 4 Is Important for p53-Mediated Cellular Functions. *Mol. Cells* **38**, 697–704 (2015).
27. Bae, J. S. *et al.* CK2 α phosphorylates DBC1 and is involved in the progression of gastric carcinoma and predicts poor survival of gastric carcinoma patients. *Int. J. Cancer* **136**, 797–809 (2015).
28. Rajendran, P. *et al.* Acetylation of CCAR2 Establishes a BET/BRD9 Acetyl Switch in Response to Combined Deacetylase and Bromodomain Inhibition. *Cancer Res.* **79**, 918–927 (2019).
29. Sundararajan, R., Chen, G., Mukherjee, C. & White, E. Caspase-dependent processing activates the proapoptotic activity of deleted in breast cancer-1 during tumor necrosis factor-alpha-mediated death signaling. *Oncogene* **24**, 4908–4920 (2005).
30. Iqbal, I. K., Bajeli, S., Sahu, S., Bhat, S. A. & Kumar, A. Hydrogen sulfide-induced GAPDH sulfhydration disrupts the CCAR2-SIRT1 interaction to initiate autophagy. *Autophagy* (2021) doi:10.1080/15548627.2021.1876342.
31. Kim, J. E. & Sung, S. Deleted in breast cancer 1 (DBC1) is a dynamically regulated protein. *Neoplasia* **57**, 365–368 (2010).
32. Escande, C. *et al.* Deleted in breast cancer 1 limits adipose tissue fat accumulation and plays a key role in the development of metabolic syndrome phenotype. *Diabetes* **64**, 12–22

- (2015).
33. Qiang, L. *et al.* Hepatic SirT1-Dependent Gain of Function of Stearoyl-CoA Desaturase-1 Conveys Dysmetabolic and Tumor Progression Functions. *Cell Rep.* **11**, 1797–1808 (2015).
 34. Escande, C. *et al.* Deleted in breast cancer-1 regulates SIRT1 activity and contributes to high-fat diet-induced liver steatosis in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 545–558 (2010).
 35. Blüher, M. The distinction of metabolically ‘healthy’ from ‘unhealthy’ obese individuals. *Curr. Opin. Lipidol.* **21**, 38–43 (2010).
 36. Stefan, N., Häring, H.-U., Hu, F. B. & Schulze, M. B. Metabolically healthy obesity: epidemiology, mechanisms, and clinical implications. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **1**, 152–162 (2013).
 37. Chang, H.-C. & Guarente, L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **25**, 138–145 (2014).
 38. Rodgers, J. T. *et al.* Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature* **434**, 113–118 (2005).
 39. Bordone, L. *et al.* Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol.* **4**, e31 (2006).
 40. Bordone, L. *et al.* Correction: Sirt1 Regulates Insulin Secretion by Repressing UCP2 in Pancreatic β Cells. *PLoS Biol.* **13**, e1002346 (2015).
 41. Sun, C. *et al.* SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell Metab.* **6**, 307–319 (2007).
 42. Schenk, S. *et al.* Sirt1 enhances skeletal muscle insulin sensitivity in mice during caloric restriction. *J. Clin. Invest.* **121**, 4281–4288 (2011).
 43. Gerhart-Hines, Z. *et al.* Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 α . *EMBO J.* **26**, 1913–1923 (2007).
 44. Picard, F. *et al.* Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing

- PPAR-gamma. *Nature* **429**, 771–776 (2004).
45. Feige, J. N. *et al.* Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metab.* **8**, 347–358 (2008).
 46. Banks, A. S. *et al.* SirT1 Gain of Function Increases Energy Efficiency and Prevents Diabetes in Mice. *Cell Metab.* **8**, 333–341 (2008).
 47. Nin, V. *et al.* Role of deleted in breast cancer 1 (DBC1) protein in SIRT1 deacetylase activation induced by protein kinase A and AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **287**, 23489–23501 (2012).
 48. Hardie, D. G., Salt, I. P., Hawley, S. A. & Davies, S. P. AMP-activated protein kinase: an ultrasensitive system for monitoring cellular energy charge. *Biochem. J.* **338 (Pt 3)**, 717–722 (1999).
 49. Chang, C. *et al.* AMPK-Dependent Phosphorylation of GAPDH Triggers Sirt1 Activation and Is Necessary for Autophagy upon Glucose Starvation. *Mol. Cell* **60**, 930–940 (2015).
 50. Yang, J. *et al.* Hepatic PKA inhibition accelerates the lipid accumulation in liver. *Nutr. Metab.* **16**, 69 (2019).
 51. Boudaba, N. *et al.* AMPK Re-Activation Suppresses Hepatic Steatosis but its Downregulation Does Not Promote Fatty Liver Development. *EBioMedicine* **28**, 194–209 (2018).
 52. Pfluger, P. T., Herranz, D., Velasco-Miguel, S., Serrano, M. & Tschöp, M. H. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 9793–9798 (2008).
 53. Moitra, J. *et al.* Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes Dev.* **12**, 3168–3181 (1998).
 54. Shimomura, I. *et al.* Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes Dev.* **12**, 3182–3194 (1998).

55. M, L. & M, B. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *Journal of lipid research* vol. 34 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8371057/> (1993).
56. Lehr, S., Hartwig, S. & Sell, H. Adipokines: a treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *Proteomics Clin. Appl.* **6**, 91–101 (2012).
57. Scheja, L. & Heeren, J. The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* **15**, 507–524 (2019).
58. Able, A. A., Richard, A. J. & Stephens, J. M. Loss of DBC1 (CCAR2) affects TNF α -induced lipolysis and Glut4 gene expression in murine adipocytes. *J. Mol. Endocrinol.* **61**, 195–205 (2018).
59. Moreno-Navarrete, J. M. *et al.* Deleted in breast cancer 1 plays a functional role in adipocyte differentiation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **308**, E554–561 (2015).
60. Hanson, R. W. & Reshef, L. Glyceroneogenesis revisited. *Biochimie* **85**, 1199–1205 (2003).
61. Moreno-Navarrete, J. M. *et al.* DBC1 is involved in adipocyte inflammation and is a possible marker of human adipose tissue senescence. *Obes. Silver Spring Md* **23**, 519–522 (2015).
62. Qiang, L. *et al.* Brown Remodeling of White Adipose Tissue by SirT1-Dependent Deacetylation of Ppar γ . *Cell* **150**, 620–632 (2012).
63. Sakurabashi, A. *et al.* CCAR2 negatively regulates nuclear receptor LXR α by competing with SIRT1 deacetylase. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **149**, 80–88 (2015).
64. Kaplon, J., van Dam, L. & Peeper, D. Two-way communication between the metabolic and cell cycle machineries: the molecular basis. *Cell Cycle Georget. Tex* **14**, 2022–2032 (2015).
65. Valcourt, J. R. *et al.* Staying alive: metabolic adaptations to quiescence. *Cell Cycle Georget. Tex* **11**, 1680–1696 (2012).
66. Qin, B. *et al.* DBC1 functions as a tumor suppressor by regulating p53 stability. *Cell Rep.* **10**, 1324–1334 (2015).

67. Yu, E. J. *et al.* Positive regulation of β -catenin-PROX1 signaling axis by DBC1 in colon cancer progression. *Oncogene* **35**, 3410–3418 (2016).
68. Morgan, D. O. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 261–291 (1997).
69. Shah, S. Evaluation of the Effects of Walnut Extract on the Cell Division G2/M Cyclin-Cyclin B1 in Breast Cancer Cells. *Masters Theses* (2016)
doi:<https://doi.org/10.31979/etd.32pr-8xtr>.
70. van Deursen, J. M. The role of senescent cells in ageing. *Nature* **509**, 439–446 (2014).
71. Sherr, C. J. D-type cyclins. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 187–190 (1995).
72. Coats, S., Flanagan, W. M., Nourse, J. & Roberts, J. M. Requirement of p27Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science* **272**, 877–880 (1996).
73. Rivard, N., L'Allemain, G., Bartek, J. & Pouysségur, J. Abrogation of p27Kip1 by cDNA antisense suppresses quiescence (G0 state) in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **271**, 18337–18341 (1996).
74. Itahana, K. *et al.* A role for p53 in maintaining and establishing the quiescence growth arrest in human cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 18206–18214 (2002).
75. Akande, O. E. *et al.* DBC1 Regulates p53 Stability via Inhibition of CBP-Dependent p53 Polyubiquitination. *Cell Rep.* **26**, 3323–3335.e4 (2019).
76. Vandel, L. *et al.* Transcriptional repression by the retinoblastoma protein through the recruitment of a histone methyltransferase. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 6484–6494 (2001).
77. Deng, C.-X. BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Res.* **34**, 1416–1426 (2006).
78. Kuchenbaecker, K. B. *et al.* Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA* **317**, 2402–2416 (2017).
79. Koyama, S. *et al.* Repression of estrogen receptor beta function by putative tumor

- suppressor DBC1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **392**, 357–362 (2010).
80. Moghadam, S. J., Hanks, A. M. & Keyomarsi, K. Breaking the cycle: An insight into the role of ER α in eukaryotic cell cycles. *J. Carcinog.* **10**, 25 (2011).
 81. Koryakina, Y., Ta, H. Q. & Gioeli, D. Androgen receptor phosphorylation: biological context and functional consequences. *Endocr. Relat. Cancer* **21**, T131-145 (2014).
 82. Kim, H. J., Moon, S. J., Kim, S.-H., Heo, K. & Kim, J. H. DBC1 regulates Wnt/ β -catenin-mediated expression of MACC1, a key regulator of cancer progression, in colon cancer. *Cell Death Dis.* **9**, 1–11 (2018).
 83. Reid, J. F. *et al.* Integrative approach for prioritizing cancer genes in sporadic colon cancer. *Genes. Chromosomes Cancer* **48**, 953–962 (2009).
 84. Zhang, Y. *et al.* DBC1 is over-expressed and associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Int. J. Clin. Oncol.* **19**, 106–112 (2014).
 85. Won, K. Y. *et al.* High DBC1 (CCAR2) expression in gallbladder carcinoma is associated with favorable clinicopathological factors. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 11440–11445 (2015).
 86. Cha, E. J. *et al.* Expression of DBC1 and SIRT1 is associated with poor prognosis of gastric carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **15**, 4453–4459 (2009).
 87. Kim, H. J., Kim, S.-H., Yu, E. J., Seo, W.-Y. & Kim, J. H. A positive role of DBC1 in PEA3-mediated progression of estrogen receptor-negative breast cancer. *Oncogene* **34**, 4500–4508 (2015).
 88. Kang, Y. *et al.* Expression of SIRT1 and DBC1 in Gastric Adenocarcinoma. *Korean J. Pathol.* **46**, 523–531 (2012).
 89. Noguchi, A. *et al.* SIRT1 expression is associated with a poor prognosis, whereas DBC1 is associated with favorable outcomes in gastric cancer. *Cancer Med.* **3**, 1553–1561 (2014).
 90. Huan, Y., Wu, D., Zhou, D., Sun, B. & Li, G. DBC1 promotes anoikis resistance of gastric cancer cells by regulating NF- κ B activity. *Oncol. Rep.* **34**, 843–849 (2015).

91. Kandath, C. *et al.* Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* **502**, 333–339 (2013).
92. Kanapathipillai, M. Treating p53 Mutant Aggregation-Associated Cancer. *Cancers* **10**, (2018).
93. Pangon, L. *et al.* MCC inhibits beta-catenin transcriptional activity by sequestering DBC1 in the cytoplasm. *Int. J. Cancer* **136**, 55–64 (2015).
94. Committee for the update of the guide for the care and use of laboratory animals. Guide for the care and use of laboratory animals. (2011).
95. Meikle, M. N., Schlapp, G., Menchaca, A. & Crispo, M. Minimum volume Spatula MVD vitrification method improves embryo survival compared to traditional slow freezing, both for in vivo and in vitro produced mice embryos. *Cryobiology* **84**, 77–81 (2018).
96. Nakagata N. Reproductive Engineering Techniques in Mice. Technical manual. in 6–13.
97. Mitchell, C. & Willenbring, H. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. *Nat. Protoc.* **3**, 1167–1170 (2008).
98. Xu, J. Preparation, culture, and immortalization of mouse embryonic fibroblasts. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **Chapter 28**, Unit 28.1 (2005).
99. Lima, A. *et al.* Serine/threonine protein kinase PrkA of the human pathogen *Listeria monocytogenes*: Biochemical characterization and identification of interacting partners through proteomic approaches. *J. Proteomics* **74**, 1720–1734 (2011).
100. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0 | Nature Protocols. <https://www.nature.com/articles/nprot.2015.133>.
101. Carvalho, P. C., Yates, J. R. & Barbosa, V. C. Improving the TFCO test for differential shotgun proteomics. *Bioinformatics* **28**, 1652–1654 (2012).
102. Rajendran, P. *et al.* Acetylation of CCAR2 Establishes a BET/BRD9 Acetyl Switch in Response to Combined Deacetylase and Bromodomain Inhibition. *Cancer Res.* **79**, 918–927

- (2019).
103. Zannini, L., Buscemi, G., Kim, J.-E., Fontanella, E. & Delia, D. DBC1 phosphorylation by ATM/ATR inhibits SIRT1 deacetylase in response to DNA damage. *J. Mol. Cell Biol.* **4**, 294–303 (2012).
 104. Adamkova, K. *et al.* SIRT1-dependent modulation of methylation and acetylation of histone H3 on lysine 9 (H3K9) in the zygotic pronuclei improves porcine embryo development. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **8**, 83 (2017).
 105. Vaquero, A. *et al.* Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol. Cell* **16**, 93–105 (2004).
 106. Katz, C. *et al.* Wild-type and cancer-related p53 proteins are preferentially degraded by MDM2 as dimers rather than tetramers. *Genes Dev.* **32**, 430–447 (2018).
 107. Kim, M.-S., Lee, H.-K., Kim, S.-Y. & Cho, J.-H. Analysis of the relationship between liver regeneration rate and blood levels. *Pak. J. Med. Sci.* **31**, 31–36 (2015).
 108. McGill, M. R. The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers. *EXCLI J.* **15**, 817–828 (2016).
 109. Oki, T. *et al.* A novel cell-cycle-indicator, mVenus-p27K-, identifies quiescent cells and visualizes G0–G1 transition. *Sci. Rep.* **4**, (2014).
 110. Mohammad, K., Dakik, P., Medkour, Y., Mitrofanova, D. & Titorenko, V. I. Quiescence Entry, Maintenance, and Exit in Adult Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
 111. Mikecz, A. von. The nuclear ubiquitin-proteasome system. *J. Cell Sci.* **119**, 1977–1984 (2006).
 112. Kito, Y. *et al.* Cell cycle-dependent localization of the proteasome to chromatin. *Sci. Rep.* **10**, 5801 (2020).
 113. Collins, G. A. & Goldberg, A. L. The Logic of the 26S Proteasome. *Cell* **169**, 792–806 (2017).
 114. Aza-Blanc, P., Ramírez-Weber, F. A., Laget, M. P., Schwartz, C. & Kornberg, T. B.

- Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. *Cell* **89**, 1043–1053 (1997).
115. Tian, L., Holmgren, R. A. & Matouschek, A. A conserved processing mechanism regulates the activity of transcription factors Cubitus interruptus and NF-kappaB. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 1045–1053 (2005).
 116. Lin, L. & Ghosh, S. A glycine-rich region in NF-kappaB p105 functions as a processing signal for the generation of the p50 subunit. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2248–2254 (1996).
 117. Palombella, V. J., Rando, O. J., Goldberg, A. L. & Maniatis, T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* **78**, 773–785 (1994).
 118. Sato, K., Ito, H., Yokoyama, A., Toba, G. & Yamamoto, D. Partial proteasomal degradation of Lola triggers the male-to-female switch of a dimorphic courtship circuit. *Nat. Commun.* **10**, 166 (2019).
 119. Rape, M. & Jentsch, S. Taking a bite: proteasomal protein processing. *Nat. Cell Biol.* **4**, E113–116 (2002).
 120. García-Rodríguez, J. L. *et al.* SIRT1 controls liver regeneration by regulating bile acid metabolism through farnesoid X receptor and mammalian target of rapamycin signaling. *Hepatology. Baltim. Md* **59**, 1972–1983 (2014).
 121. Borude, P. *et al.* P53 Regulates Progression of Injury and Liver Regeneration After Acetaminophen Overdose. *FASEB J.* **31**, 531.8–531.8 (2017).
 122. Ju, C. *et al.* Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 is required for hepatocyte proliferation and liver regeneration in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **511**, 531–535 (2019).
 123. Tanikawa, M. *et al.* Role of multifunctional transcription factor TFII-I and putative tumour suppressor DBC1 in cell cycle and DNA double strand damage repair. *Br. J. Cancer* **109**, 3042–3048 (2013).

124. Kopelman, P. G. Obesity as a medical problem. *Nature* **404**, 635–643 (2000).
125. Kahn, S. E., Hull, R. L. & Utzschneider, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* **444**, 840–846 (2006).
126. Klöting, N. *et al.* Insulin-sensitive obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **299**, E506–515 (2010).
127. Virtue, S. & Vidal-Puig, A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. *Biochim. Biophys. Acta* **1801**, 338–349 (2010).
128. Alfadda, A. A. Circulating Adipokines in Healthy versus Unhealthy Overweight and Obese Subjects. *International Journal of Endocrinology* vol. 2014 e170434 <https://www.hindawi.com/journals/ije/2014/170434/> (2014).
129. Boyarinova, M. A. *et al.* [Adipokines Level in Metabolically Healthy Obese Saint-Petersburg Inhabitants (ESSE-RF)]. *Kardiologiia* **56**, 40–45 (2016).
130. Marion, V. *et al.* BBS-Induced Ciliary Defect Enhances Adipogenesis, Causing Paradoxical Higher-Insulin Sensitivity, Glucose Usage, and Decreased Inflammatory Response. *Cell Metab.* **16**, 363–377 (2012).
131. Forsyth, R. & Gunay-Aygun, M. Bardet-Biedl Syndrome Overview. in *GeneReviews®* (eds. Adam, M. P. *et al.*) (University of Washington, Seattle, 1993).
132. Mykytyn, K. *et al.* Bardet–Biedl syndrome type 4 (BBS4)-null mice implicate Bbs4 in flagella formation but not global cilia assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 8664–8669 (2004).
133. V, P.-E. *et al.* BBS4 regulates the expression and secretion of FSTL1, a protein that participates in ciliogenesis and the differentiation of 3T3-L1. *Sci. Rep.* **7**, 9765–9765 (2017).
134. Ouchi, N. *et al.* Follistatin-like 1, a secreted muscle protein, promotes endothelial cell function and revascularization in ischemic tissue through a nitric-oxide synthase-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **283**, 32802–32811 (2008).

135. Recinella, L. *et al.* Adipokines: New Potential Therapeutic Target for Obesity and Metabolic, Rheumatic, and Cardiovascular Diseases. *Front. Physiol.* **11**, (2020).
136. Chiba, A., Watanabe-Takano, H., Miyazaki, T. & Mochizuki, N. Cardiomyokines from the heart. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **75**, 1349–1362 (2018).
137. Green, H. & Meuth, M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* **3**, 127–133 (1974).
138. Pellitteri-Hahn, M. C. *et al.* Improved Mass Spectrometric Proteomic Profiling of the Secretome of Rat Vascular Endothelial Cells. *J. Proteome Res.* **5**, 2861–2864 (2006).
139. Stoekenbroek, R. M., Lambert, G., Cariou, B. & Hovingh, G. K. Inhibiting PCSK9 - biology beyond LDL control. *Nat. Rev. Endocrinol.* **15**, 52–62 (2018).
140. Dzimianski, J. V., Scholte, F. E. M., Bergeron, É. & Pegan, S. D. ISG15: It's Complicated. *J. Mol. Biol.* **431**, 4203–4216 (2019).
141. Cocciolone, A. J. *et al.* Extracellular Matrix in Cardiovascular Pathophysiology: Elastin, arterial mechanics, and cardiovascular disease. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* **315**, H189 (2018).
142. Bauters, D., Bedossa, P., Lijnen, H. R. & Hemmeryckx, B. Functional role of ADAMTS5 in adiposity and metabolic health. *PLOS ONE* **13**, e0190595 (2018).
143. Zhuo, L., Hascall, V. C. & Kimata, K. Inter- α -trypsin Inhibitor, a Covalent Protein-Glycosaminoglycan-Protein Complex. *J. Biol. Chem.* **279**, 38079–38082 (2004).
144. Cardoso, A. L. *et al.* Towards frailty biomarkers: Candidates from genes and pathways regulated in aging and age-related diseases. *Ageing Res. Rev.* **47**, 214–277 (2018).
145. Wei, K. *et al.* Epicardial FSTL1 reconstitution regenerates the adult mammalian heart. *Nature* **525**, 479–485 (2015).
146. Fain, J. N., Madan, A. K., Hiler, M. L., Cheema, P. & Bahouth, S. W. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from

- visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* **145**, 2273–2282 (2004).
147. Alessi, M. C. *et al.* Production of plasminogen activator inhibitor 1 by human adipose tissue: possible link between visceral fat accumulation and vascular disease. *Diabetes* **46**, 860–867 (1997).
148. Hocking, S. L., Wu, L. E., Guilhaus, M., Chisholm, D. J. & James, D. E. Intrinsic depot-specific differences in the secretome of adipose tissue, preadipocytes, and adipose tissue-derived microvascular endothelial cells. *Diabetes* **59**, 3008–3016 (2010).
149. Fan, N. *et al.* Follistatin-like 1: a potential mediator of inflammation in obesity. *Mediators Inflamm.* **2013**, 752519 (2013).
150. Le Luduec, J. B. *et al.* An immunomodulatory role for follistatin-like 1 in heart allograft transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **8**, 2297–2306 (2008).
151. Wu, Y., Zhou, S. & Smas, C. M. Downregulated expression of the secreted glycoprotein follistatin-like 1 (Fstl1) is a robust hallmark of preadipocyte to adipocyte conversion. *Mech. Dev.* **127**, 183–202 (2010).
152. Horak, M., Kuruczova, D., Zlamal, F., Tomandl, J. & Bienertova-Vasku, J. Follistatin-Like 1 Is Downregulated in Morbidly and Super Obese Central-European Population. *Dis. Markers* **2018**, 4140815 (2018).
153. Shin, J. *et al.* Comparative analysis of differentially secreted proteins in serum-free and serum-containing media by using BONCAT and pulsed SILAC. *Sci. Rep.* **9**, 3096 (2019).
154. Colman, L. *et al.* The protein Deleted in Breast Cancer-1 (DBC1) regulates vascular response and formation of aortic dissection during Angiotensin II infusion. *Sci. Rep.* **10**, (2020).
155. Ghosh, A. K. & Vaughan, D. E. PAI-1 in Tissue Fibrosis. *J. Cell. Physiol.* **227**, 493–507 (2012).

156. Sun, K., Tordjman, J., Clément, K. & Scherer, P. E. Fibrosis and Adipose Tissue Dysfunction. *Cell Metab.* **18**, 470–477 (2013).
157. Martinez-Santibanez, G. *et al.* Obesity-induced remodeling of the adipose tissue elastin network is independent of the metalloelastase MMP-12. *Adipocyte* **4**, 264–272 (2015).
158. Stanton, H. *et al.* ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature* **434**, 648–652 (2005).
159. Zeng, T. *et al.* ADAMTS-5 Decreases in Aortas and Plasma From Aortic Dissection Patients and Alleviates Angiotensin II-Induced Smooth Muscle-Cell Apoptosis. *Front. Cardiovasc. Med.* **7**, (2020).
160. Bauters, D. *et al.* ADAMTS5 deficiency protects against non-alcoholic steatohepatitis in obesity. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* **36**, 1848–1859 (2016).
161. Chan, C. C. *et al.* Type I interferon sensing unlocks dormant adipocyte inflammatory potential. *Nat. Commun.* **11**, 2745 (2020).
162. López-Sendón, J., Castro, A. & Dalmau, R. Una historia resumida. La inhibición de la PCSK9 y su desarrollo clínico. *Rev. Esp. Cardiol.* **17**, 10–15 (2017).
163. Thomas, K. R. & Capecchi, M. R. Targeted disruption of the murine int-1 proto-oncogene resulting in severe abnormalities in midbrain and cerebellar development. *Nature* **346**, 847–850 (1990).
164. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2007. NobelPrize.org. Nobel Media AB 2021. Mon. 15 Feb 2021.
165. Accili, D. *et al.* Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat. Genet.* **12**, 106–109 (1996).
166. Joshi, R. L. *et al.* Targeted disruption of the insulin receptor gene in the mouse results in neonatal lethality. *EMBO J.* **15**, 1542–1547 (1996).
167. Brüning, J. C. *et al.* A Muscle-Specific Insulin Receptor Knockout Exhibits Features of the

- Metabolic Syndrome of NIDDM without Altering Glucose Tolerance. *Mol. Cell* **2**, 559–569 (1998).
168. Michael, M. D. *et al.* Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol. Cell* **6**, 87–97 (2000).
169. Blüher, M. *et al.* Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev. Cell* **3**, 25–38 (2002).
170. Van Duyne, G. D. Cre Recombinase. *Microbiol. Spectr.* **3**, MDNA3-0014–2014 (2015).
171. Barman, A., Deb, B. & Chakraborty, S. A glance at genome editing with CRISPR-Cas9 technology. *Curr. Genet.* **66**, 447–462 (2020).
172. Zhu, X. *et al.* An efficient genotyping method for genome-modified animals and human cells generated with CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.* **4**, 6420 (2014).
173. Hendel, A. *et al.* Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nat. Biotechnol.* **33**, 985–989 (2015).
174. Jeffery, E. *et al.* Characterization of Cre recombinase models for the study of adipose tissue. *Adipocyte* **3**, 206–211 (2014).
175. Indra, A. K. *et al.* Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic Acids Res.* **27**, 4324–4327 (1999).
176. Guilherme, A. *et al.* Adipocyte lipid synthesis coupled to neuronal control of thermogenic programming. *Mol. Metab.* **6**, 781–796 (2017).
177. Jeffery, E. *et al.* The Adipose Tissue Microenvironment Regulates Depot-Specific Adipogenesis in Obesity. *Cell Metab.* **24**, 142–150 (2016).
178. Ye, R. *et al.* Impact of tamoxifen on adipocyte lineage tracing: Inducer of adipogenesis and prolonged nuclear translocation of Cre recombinase. *Mol. Metab.* **4**, 771–778 (2015).