



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biomedicina.

**NF- κ B E Id2 COMO NODOS DE REGULACIÓN DE
REDES TRANSCRIPCIONALES EN DIFERENTES
MODELOS BIOLÓGICOS.**

Tesis doctoral presentada por:

Iván Ferrer Vicens

Directores:

Prof. Juan Viña Ribes

Prof. Elena Ruíz García-Trevijano

Dr. JUAN VIÑA RIBES. Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia.

Dra. ELENA RUIZ GARCÍA-TREVIJANO Profesora Titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia.

INFORMAN:

Que D. **IVÁN FERRER VICENS**, Licenciado en Biología por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento el presente trabajo de investigación, titulado “NF- κ B E Id2 COMO NODOS DE REGULACIÓN DE REDES TRANSCRIPCIONALES EN DIFERENTES MODELOS BIOLÓGICOS” o “NF- κ B AND Id2 AS NODES OF TRANSCRIPTIONAL REGULATORY NETWORKS IN DIFFERENT BIOLOGICAL MODELS”, el cual posee la suficiente calidad científica para ser presentado en la obtención del grado de Doctor en Bioquímica y Biomedicina.

Y para que conste a todos los efectos, firman la presente certificación.

Dr. Juan Viña Ribes

Dra. Elena Ruiz García-Trevijano

En Valencia, a 21 de Octubre de 2014

El presente trabajo ha sido subvencionado con ayudas del Ministerios de Economía y Competitividad (BFU2010-18253 y BFU2013-46434-P), del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, incluyendo fondos FEDER (PS09/02360 y PI12/02394) y de la Generalitat Valenciana (GV PROMETEO 2010-075 y PROMETEO II/2014/055).

Agradecimientos

He de decir que me alegra estar escribiendo los agradecimientos, puesto que significa que, por fin, he finalizado tan arduo trabajo. Si bien, dicho trabajo no hubiese llegado a su fin sin el gran aporte de todas las personas que lo han hecho posible. Aunque, los que me conocen saben que no soy hombre de muchas palabras, me gustaría expresar mis más sinceros agradecimientos a todos ellos.

En primer lugar, agradecer de manera singular al Profesor Juan R. Viña por abrirme las puertas de su laboratorio y por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección. Recordaré de forma especial sus grandes consejos acompañados siempre de una frase célebre, su preocupación y compromiso, así como su experiencia en este campo, puesto que no solamente han ayudado al desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigador.

Expresar también mi más sincero agradecimiento a mi directora, la Dra. Elena R. García-Trevijano, porque este trabajo de tesis no se hubiese podido concebir sin su participación y aporte constante. Además, gracias a las amplias conversaciones que hemos tenido, empiezo a entender algo de este amplio mundo, el

mundo de la biología molecular. Le agradezco también su capacidad para guiar y orientar todas mis ideas, no solo a la hora de realizar experimentos, sino también en el momento de escribir este trabajo.

Quiero agradecer a la Dra. Rosa Zaragoza, a quien también considero como mi directora de tesis. Le agradezco sus enseñanzas, principalmente en mis primeros pasos en la bancada del laboratorio, por sus siempre atentas y rápidas respuestas a las diferentes inquietudes, así como su amabilidad y su gran apoyo. Igualmente, quiero dar mis más sinceros agradecimientos a Concha García, porque nunca he conocido a una persona más atenta y organizada que ella. Aprovecho para agradecer al Dr. Luis Torres, quien también ha colaborado con nosotros activamente durante mis años en el laboratorio.

A todos mis amigos y compañeros de doctorado que han pasado en algún momento por el laboratorio: Ana Bosch, Teresa, Desam, Fani, Juan Moreno, Elena de la Paz, Pepa, Patri, Marcelino, Ángela y Lucia. Por hacer que los largos días de laboratorio no lo sean tanto. Gracias por las risas compartidas, los momentos de distracción y por hacerme sentir como en familia. Agradecer también a M^a José, Elena y Arantxa, aunque pertenezcan a otro grupo de investigación, las considero como de mi mismo grupo. Y como no, ahí van mis agradecimientos al grupo LABIMM-LABAM: Dani, Reme, Jose Manuel, Vannina, Eva, Jessica, Antonio y Mercedes. Gracias por esas largas comidas, por esas risas y buenos

momentos que nunca olvidaré. A todos ellos les doy las gracias por hacer que ir a trabajar cada día sea una experiencia más agradable y más enriquecedora.

Para todos los miembros del departamento de Bioquímica y Biología Molecular, en especial a la Sección de Medicina: Dra. Alonso, Dr. Jover, Dr. O'Connor, Dr. Salgado, Dra. Puertes y a la Dra. Donato por sus consejos y horas de docencia compartidas, así como al resto de doctorandos del departamento: Susana, Angie y Juan Carlos. A todo el personal administrativo, en especial a Paco Tevar, Maria Belenguer y a Fede, por todas sus sugerencias de tipo administrativo para legalizar la documentación durante estos años, así como la paciencia por los trámites que sugiere este tipo de proyectos.

I would like to thank the group of Professor Christine Watson for allowing me to do my doctoral stay in his magnificent laboratory. Thanks to Teresa Ho, Henrike, Kate, Hayley, Jonathan, Tim, Bethan and especially Sara Pensa. I also want to thank all the Spanish friends I made in Cambridge. All of them made my stay in Cambridge unforgettable.

En el ámbito personal mis más sinceros agradecimientos a todos mis amigos, Adela, Angela, Celia, David, Domingo, Juan, Laura, Lidia, Maite, M^aJose, Nestor, Paula, Pedro, Roser, Vero, Vicent, Vicente, etc; por los buenos ratos que hemos pasado juntos y por haberme hecho desconectar por completo del mundo de la

investigación. Aprovecho para agradecer también a todos mis amigos y compañeros de la facultad: Aina, Belen, Blai, Fani, Isa, Kitty, Luis, Mar, Pepo, Reme, Victor, Vila, etc., por acompañarme en esta larga y complicada carrera que juntos empezamos y por los momentos de risas en esas cenas, que desafortunadamente, cada vez son más escasas.

Y, por supuesto, el agradecimiento más profundo y sentido va para toda mi familia. En especial agradecerles a mis padres su afecto, paciencia y apoyo incondicional. A mi hermana Carla, amiga y compañera en estos largos años en Valencia, juntos hemos finalizado nuestros estudios. Porque, aun no entendiendo mucho de ciencia, siempre me han ofrecido su ayuda y colaboración.

Índice

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	9
I. LAS REDES TRANSCRIPCIONALES COMO OBJETO DE ESTUDIO DE LA GENÓMICA FUNCIONAL.....	11
II. COORDINACIÓN DE SEÑALES EN UN MISMO TEJIDO.	13
III. NF- κ B COMO NODO DE REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL	16
<i>III.1. Mecanismos de regulación de NF-κB por translocación nuclear.....</i>	<i>18</i>
<i>III.2. Mecanismos de regulación de NF-κB por modificaciones post- traduccionales y regulación de su actividad transactivadora.</i>	<i>21</i>
IV. PAPEL DE NF- κ B EN LA COORDINACIÓN DE DISTINTOS PROCESOS BIOLÓGICOS.	25
<i>IV.1. NF-κB y apoptosis</i>	<i>25</i>
<i>IV.2. NF-κB y proliferación.....</i>	<i>29</i>
<i>IV.3. NF-κB e inflamación</i>	<i>31</i>
V. ID2 COMO NODO DE REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL.....	33
<i>V.1. Mecanismos de regulación de la actividad y de la función de Id2. .</i>	<i>36</i>
VI. PAPEL DE ID2 EN LA COORDINACIÓN DE DISTINTOS PROCESOS BIOLÓGICOS.....	43
<i>VI.1. Id2 y apoptosis.....</i>	<i>43</i>
<i>VI.2. Id2 y proliferación</i>	<i>45</i>
<i>VI.3. Id2, desarrollo y diferenciación.....</i>	<i>49</i>

VII.	MODELOS FISIOLÓGICOS DE CONFLUENCIA Y COORDINACIÓN DE SEÑALES.....	52
	VII.1. <i>La glándula mamaria como modelo de redes de coordinación de señales.....</i>	54
	VII.2. <i>El hígado como modelo de redes de coordinación de señales.....</i>	63
	OBJETIVOS	79
I.	OBJETIVOS	81
	MATERIALES Y MÉTODOS	85
I.	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	87
II.	CULTIVOS CELULARES.....	89
III.	EXTRACCIÓN DE TEJIDO	89
IV.	EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	90
V.	AISLAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE RNA	91
VI.	FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR.....	91
VII.	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA POR QPCR	92
VIII.	CUANTIFICACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR	94
IX.	MEDIDA DE ACTIVIDAD CALPAÍNA	94
X.	TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS.....	95
	X.1. <i>Anticuerpos</i>	95
	X.2. <i>Western blotting</i>	95
	X.3. <i>Inmunofluorescencia</i>	98
	X.4. <i>Inmunoprecipitación.....</i>	99

X.5.	<i>Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP assay)</i>	100
XI.	ENSAYO DE PROTECCIÓN FRENTE A NUCLEASA DE MICROCOCO	102
XI.1.	<i>Nuc-ChIP assay</i>	103
XII.	CHIP/CHIP	106
XII.1.	<i>Amplificación y etiquetado del cDNA</i>	106
XII.2.	<i>Microarray</i>	107
XII.3.	<i>Análisis de los datos</i>	108
XIII.	ENSAYOS IN VITRO DE FRAGMENTACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIADA POR CALPAÍNAS	109
XIV.	ENSAYOS DE SILENCIAMIENTO GÉNICO CON SIRNA	110
XV.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	111
RESULTADOS	113
I.	NF- κ B COMO NODO DE REGULACIÓN DE REDES TRANSCRIPCIONALES DURANTE LA INVOLUCIÓN DE LA GLÁNDULA MAMARIA.....	115
I.1	<i>Identificación de los genes diana de NF-κB en la involución de la glándula mamaria de ratón mediante análisis de ChIP/chip.</i>	116
I.2	<i>Análisis funcional de los genes diana de p65</i>	119
I.3	<i>Identificación de los genes diana de NF-κB transcripcionalmente activos mediante ChIP/chip de p65/p300</i>	121
I.4	<i>Posible papel de NF-κB como nodo de coordinación de diferentes procesos biológicos durante la involución de la glándula mamaria</i>	125

I.5	<i>Cooperación de elementos en los promotores a los que se une p65/p300.</i>	128
I.6	<i>Relación entre el input y el output primario: Análisis de la unión de p65/p300 a los promotores génicos y correlación con la expresión génica.</i>	136
II.	ENLACE FUNCIONAL ENTRE NF-KB Y SUS GENES DIANA: IMPLICACIÓN DE LAS CALPAÍNAS DURANTE LA INVOLUCIÓN DE LA GLÁNDULA MAMARIA.	140
II.1	<i>Análisis de la expresión de los genes que codifican las calpaínas 1 y 2 a lo largo de la involución.</i>	141
II.2	<i>Activación de las calpaínas durante la involución.</i>	143
II.3	<i>Localización celular de las calpaínas en la glándula mamaria durante la involución.</i>	145
II.4	<i>Papel de la calpaína-2 en la desestabilización de las uniones intercelulares del epitelio luminal durante el destete</i>	149
III.	ID2 COMO NODO DE REGULACIÓN DE REDES TRANSCRIPCIONALES EN EL HÍGADO.	158
III.1	<i>Identificación de genes diana de E2F4/Id2 en hígado de ratón mediante análisis ChIP/chip.</i>	160
III.2	<i>Cooperación de elementos en los promotores a los que se une E2F4/Id2</i>	162
III.3	<i>Posible papel de Id2 como nodo de coordinación en diferentes procesos biológicos en el hígado: Funciones moleculares y biológicas de los genes a los que se une E2F4/Id2</i>	167

III.4	<i>Relación entre el input y el output primario: Dinámica de unión de Id2 a los promotores en el desarrollo hepático y correlación con la expresión génica.....</i>	174
III.5	<i>Modulación de la abundancia y distribución subcelular de Id2 durante el desarrollo hepático.</i>	177
III.6	<i>Papel de Id2 en la ocupación nucleosomal y el pausado de Pol II en la región downstream del TSS durante el desarrollo hepático.</i>	183
III.7	<i>Reversibilidad del pausado de Pol II y de la unión de Id2 a los promotores génicos al inicio de la regeneración hepática.</i>	188
IV.	DESREGULACIÓN DE LOS NODOS TRANSCRIPCIONALES Y SU RELACIÓN CON EL CÁNCER.....	193
IV.1	<i>Análisis de la implicación de los genes diana NF-κB en cáncer.....</i>	193
IV.2	<i>Análisis de la implicación de los genes diana E2F4/Id2 en cancer</i>	193
DISCUSIÓN.....		197
I.	ESTUDIO DE NODOS DE REGULACIÓN DE REDES TRANSCRIPCIONALES.....	199
II.	LA GLÁNDULA MAMARIA EN INVOLUCIÓN Y EL HÍGADO COMO MODELOS DE ESTUDIO DE REDES TRANSCRIPCIONALES	200
III.	NF- κ B COMO NODO DE REGULACIÓN DE REDES TRANSCRIPCIONALES DURANTE LA INVOLUCIÓN DE LA GLÁNDULA MAMARIA.....	203
III.1	<i>Análisis genómico y output inicial o primario</i>	203
III.2	<i>Control del Input: Elementos cooperadores de NF-κB.....</i>	207

III.3	<i>Análisis del programa funcional. Output final o secundario.</i>	210
IV.	Id2 COMO NODO DE REGULACIÓN DE REDES TRANSCRIPCIONALES EN EL HÍGADO.....	217
IV.1	<i>Análisis genómico y output inicial o primario.....</i>	217
IV.2	<i>Control del Input: Regulación de los niveles de Id2 y módulos de cooperación</i>	220
IV.3	<i>Análisis del programa funcional. Output final o secundario.</i>	223
	CONCLUSIONES.....	227
	ABSTRACT	231
I.	INTRODUCTION	233
II.	AIMS	240
III.	RESULTS AND DISCUSSION.....	242
III.1.	<i>NF-κB as node of transcriptional regulation during mammary gland involution.....</i>	242
III.2.	<i>Id2 as a node of transcriptional regulation in liver.</i>	243
III.3.	<i>Deregulation of transcriptional regulatory nodes: prospective implications in cancer.....</i>	245
IV.	CONCLUSIONS.....	248
	BIBLIOGRAFÍA	251

ABREVIATURAS

AD	Dominio de activación de la transcripción.
APC	Poliposis Coli Adenomatosa.
APC/Cdh1	Complejo Promotor de Anafase/Cdh1 (Ligasa de ubiquitina E3).
APO-1	Antígeno de apoptosis 1.
BAX	Proteína X asociada a Bcl-2.
bHLH	Proteína hélice-bucle-hélice básica.
BSA	Albúmina de suero bovino.
BSO	L-butionina sulfoximina.
CAPN1	Calpaína 1.
CAPN2	Calpaína 2.
CAPN4 o CAPNS1	Calpaína 4.
CDK	Quinasa dependiente de ciclina.
CDKI	Inhibidores de CDK.
CDKN1A	Inhibidor de quinasas dependientes de ciclina p21.
Células Nk	Células <i>Natural Killer</i> .
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina.
COL1A1	Procolágeno $\alpha 1$ (I).
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta de cAMP.

DNMT1	DNA (citosina-5)-metiltransferasa 1.
DSIF	Factor inductor de sensibilidad a DRB.
DUB	Enzima deubiquitinasa.
E-cdh	E-Caderina.
E-cdh⁹⁵	Fragmento de 95kDa de la E-Caderina.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
EGFR	Factor de crecimiento epidérmico.
ERK	Quinasas reguladas por señales extracelulares.
EtOH	Etanol.
FASL	Ligando de FAS.
FDR	<i>False Discovery Rate.</i>
GADPH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
GO	<i>Gene Ontology.</i>
HAT	Histona acetil transferasa.
HCC	Hepatocarcinoma.
HDAC	Histona desacetilasa.
HLH	Proteína hélice-bucle-hélice.
IAP	Proteína inhibidora de la apoptosis.
Id	Inhibidor de la diferenciación.

IF	Inmunofluorescencia.
IL	Interleuquina.
IκB	Proteína inhibidora de κB.
Ikk	Complejo quinasa de IκB.
IP	Inmunoprecipitación.
JAK	Janus Quinasas.
Jmjd6	Proteína que contiene dominio de Jumonji 6.
KLF	<i>Kruppel-like factor.</i>
LIF	Factor inhibidor de la leucemia.
MMP	Metaloproteasa.
MNasa	Nucleasa de micrococo.
NELF	Factor de elongación negativo.
NES	Secuencia nuclear de exportación.
NF-κB	Factor nuclear kappa B.
NIK	Quinasa inductora de NF-κB.
NLS	Señal de localización nuclear.
NOS2 o iNoS	Óxido nítrico sintasa inducible.
OPC	Células precursoras de oligodendrocitos.
OSM	Oncostatina M.

P120	Catenina p120.
PBS	Tampón fosfato salino.
PHx	Hepatectomía parcial.
PMCA2	ATPasa de membrana plasmática 2.
Pol II	RNA polimerasa II.
pRB	Proteína del Retinoblastoma.
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.
RB	Familia constituida por las <i>pocket proteins</i> y pRB.
RHD	Dominio homólogo Rel.
SDS	Dodecilsulfato sódico.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción.
Suv39H1	Supresor de la variegación 3-9 homólogo 1.
Talina¹³⁰	Fragmento de 130 KDa de talina 1.
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TIMPS	Inhibidores Tisulares de Metaloproteasas.

TNF	Factor de necrosis tumoral.
TNFR	Receptor de TNF.
tRNA	RNA de transferencia.
TSR	Región con más de un sitio de inicio de la transcripción.
TSS	Sitio de inició de la transcripción.
Ub	Ubiquitina.
USP1	Proteasas especifica de ubiquitina 1.
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular.
WB	<i>Western blot.</i>
β-Cat	β -Catenina.
β-Cat⁷⁵	Fragmento de 75 kDa de β -Catenina.

INTRODUCCIÓN

I. Las redes transcripcionales como objeto de estudio de la genómica funcional.

Durante décadas, el estudio de la regulación de la transcripción génica ha supuesto uno de los mayores retos de la Biología Molecular. Determinar los factores o elementos que controlan el patrón preciso de expresión génica para cada tipo celular, o lo que es lo mismo, descifrar aquellos mecanismos de modulación que permiten que un determinado gen se exprese en el lugar adecuado, el momento adecuado y al nivel adecuado, sigue siendo hoy por hoy un punto clave para entender el comportamiento celular.

Con el desarrollo de la tecnología de obtención de datos masivos, tales como los microarrays de DNA, los RNA-seq, CHIP/chip o CHIP-seq, se han puesto de manifiesto las limitaciones que suponían para el estudio de las complejas redes transcripcionales el análisis del genoma en una única dimensión. En otras palabras, el estudio del genoma y de los complejos mecanismos que dirigen las redes transcripcionales, no puede abordarse asociando un determinado locus génico a un proceso biológico concreto, una función fisiológica o un papel en una determinada patología. Por el contrario, el genoma debería verse como una estructura altamente organizada con una densa información que debe ser transcrita de forma precisa. Cada región genómica responderá de forma variada a señales reguladoras y estímulos medioambientales a través de una miríada de RNAs y proteínas. Esta visión más reciente del genoma cobra especial importancia cuando se trata de elucidar las complejas bases

moleculares de las distintas patologías que afectan al ser humano, en las que más que los genes individuales, son las redes de genes e interacciones entre sus productos las que llevarán a la célula a la adquisición de un fenotipo concreto.

Para añadir un nivel adicional de complejidad al estudio de la regulación de la expresión génica, con frecuencia, en un mismo proceso biológico se producen simultáneamente varios procesos moleculares o celulares. Por ejemplo, durante la organogénesis, procesos como la división celular, la adhesión, la diferenciación y la apoptosis se coordinan de forma precisa. Dicha coordinación requiere interacciones entre los distintos niveles de regulación de expresión génica tales como la modulación de la estructura de la cromatina, el acceso de los factores de transcripción, el inicio y elongación de la transcripción, el splicing, la traducción y un largo etcétera de niveles moleculares de regulación. Cada uno de los niveles de esta extensa lista han sido estudiados por lo general de forma individual e independiente y, sin embargo, la información derivada de dichos estudios no resulta en absoluto despreciable. En efecto, cada pequeño nivel de regulación molecular puede tener profundos efectos en el fenotipo de la célula. Dichos efectos cobrarán más importancia en tanto en cuanto se produzca una mayor interacción entre vías de señalización o entre redes transcripcionales.

II. Coordinación de señales en un mismo tejido.

Los estudios de los sistemas de transducción de señales y de los mecanismos de comunicación intercelular han experimentado un extraordinario desarrollo en los últimos años. Estos llevan a la incorporación de nuevos conceptos críticos para poder entender cómo las células reciben y coordinan señales del entorno y de otras células del mismo organismo.

Los sistemas de comunicación y señalización celular son fundamentales en la coordinación de las funciones de los distintos tipos celulares a través de la regulación de la expresión génica y de la función de las proteínas. Estos sistemas serán los que controlen en qué momento, dónde y por cuánto tiempo se expresen los diferentes genes. En el caso de las proteínas, los mecanismos de señalización celular controlan, además, los cambios de localización, el tráfico de proteínas dentro de una célula, el momento en el que se van a degradar, así como las interacciones funcionales que establecen. De este modo, una misma proteína puede presentar funciones biológicas completamente distintas. De ahí que la alteración de estos sistemas sea la base de múltiples patologías, como el cáncer, la diabetes, enfermedades cardiovasculares, inflamatorias o neuro-degenerativas.

Además, en los últimos años se ha observado que, a diferencia de lo que se pensaba anteriormente, una misma vía de señalización puede modular diferentes procesos biológicos, como la proliferación celular o la muerte celular por apoptosis. En la literatura científica existen una multitud de referencias que

constatan la existencia de señales pleiotrópicas que aparecen con frecuencia desreguladas en distintas patologías:

- Los receptores de muerte celular CD95 (Fas, APO-1) o los receptores de factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) pueden participar tanto en procesos de muerte celular como en proliferación (Budd, 2002; Reinehr et al. 2008; Reinehr & Häussinger, 2007).
- Otro claro ejemplo de ello es la amplia variedad de efectos que desempeña el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), en función del contexto y del ambiente celular. Entre ellos se incluye el control del crecimiento y la diferenciación, apoptosis, la remodelación de la matriz extracelular y la modulación de la respuesta inmune (Massagué, 1998; Wrana, 2000; Koniaris et al. 2003).

Sin embargo, el eje central de las redes transcripcionales está constituido por genes que codifican factores de transcripción y elementos reguladores en cis que controlan la expresión de dichos genes. Tal como se representa en la **figura 1**, cada uno de dichos elementos en cis recibe múltiples *inputs* de otros genes en la red. Los *inputs* serían los factores de transcripción para los cuales los elementos en cis contienen una secuencia de unión. Se podría decir por tanto, que los enlaces funcionales que componen las redes transcripcionales son aquellos entre los *outputs* de genes reguladores (*output* primario) y las dianas de dichos genes en la célula (*output* secundario) que, en última instancia, se manifestarán

como la serie de cambios de comportamiento o de las estructuras celulares que caracterizan un proceso biológico.

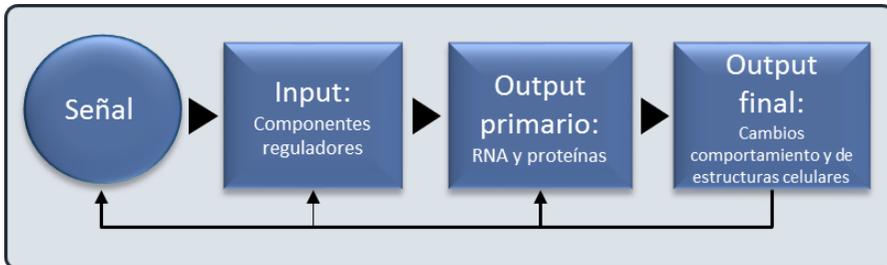


Figura 1: Circuitos o flujo de redes transcripcionales

Desde este punto de vista, para entender por qué un determinado proceso tiene lugar en la forma en que lo hace, requiere el conocimiento de los *inputs* y los *outputs* a través de todo el sistema de regulación genómico que controla el proceso. Dado que cada gen recibe multitud de *inputs*, el estudio de cada *input* o combinación de ellos resultaría una tarea inabordable. Sin embargo, no todos los *inputs* tienen la misma relevancia, habiéndose descrito componentes críticos de las redes transcripcionales, tanto por sus efectos pleiotrópicos como por su destacado papel en la progresión tumoral o en diversas patologías que hace de ellos importantes candidatos como dianas terapéuticas.

III. NF-κB como nodo de regulación transcripcional.

El factor de transcripción NF-κB, ha sido descrito como un mediador clave en muchos procesos biológicos, no sólo de las respuestas inflamatorias, sino también de otras actividades celulares como la proliferación celular, la muerte celular por apoptosis, diferenciación, etc (Skaug et al. 2009). Además, existen numerosos trabajos que implican la desregulación de NF-κB en diversas situaciones patológicas como el cáncer, la arteriosclerosis o la diabetes (Courtois & Gilmore, 2006; Baldwin, 2001). Por este motivo, la comprensión de los mecanismos de regulación de NF-κB y la transcripción de sus genes diana es un tema de intensa investigación en numerosos laboratorios.

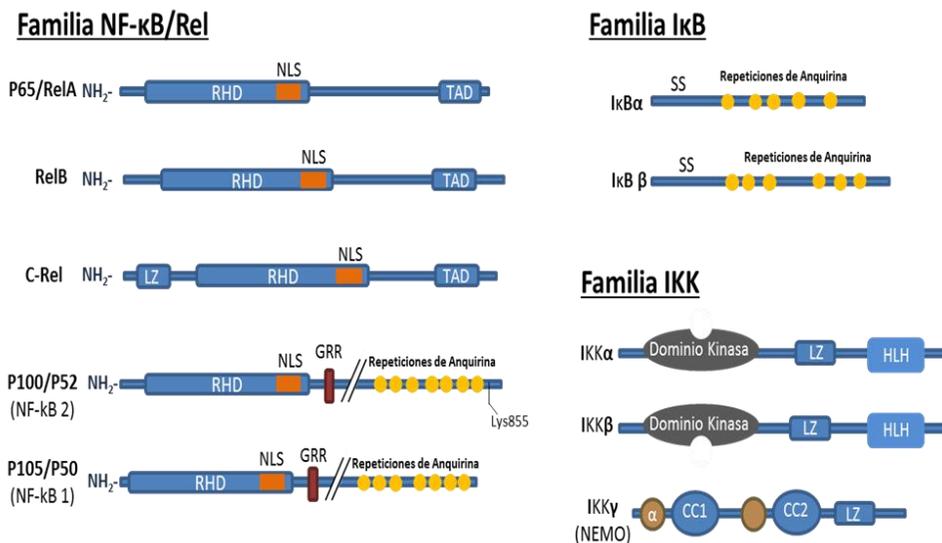


Figura 2. Representación esquemática de la familia de proteínas NF-κB, IκB e IKK. El nombre de cada proteína aparece a la izquierda. (NLS) Señales de localización nuclear; (Lys885) sitio de poliubiquitinación de P100; (Círculo amarillo) dominios de anquirina; (RHD) dominio de homología Rel; (TAD) dominio de transactivación; (LZ) dominio de cremallera de leucina en IKKα/β y C-Rel; (GRR) región rica en glicina; (HLH) dominio hélice-loop-hélice; (CC1 / 2) espiral-bobina dominios; (α) dominio α-helicoidal.

La familia del factor de transcripción NF- κ B en los mamíferos consta de cinco proteínas: RelA (p65), RelB, c-Rel, p105/p50 (NF- κ B1), y p100/52 (NF- κ B2) que se asocian entre sí para formar homodímeros o heterodímeros transcripcionalmente activos (**Figura 2**). Todos ellos comparten unos 300 aminoácidos en el extremo amino terminal, el llamado dominio homólogo Rel (RHD) (Baldwin, 1996; Ghosh et al. 1998). Estas secuencias se requieren para la dimerización, la unión al DNA, la interacción con sus inhibidores naturales I κ Bs, así como para la translocación nuclear. El análisis de la estructura tras la obtención de los cristales de p50/p65 unido al DNA, reveló que la parte amino-terminal del dominio RHD media la unión a la secuencia consenso de sus genes diana (5'-GGGPuNNPPyCC-3'), mientras que la parte carboxi-terminal de RHD es principalmente responsable de la dimerización y la interacción con I κ Bs (Ghosh et al. 1995; Müller et al. 1995; Chen et al. 1998). Cada una de estas interacciones es susceptible de ser regulada y condiciona la actividad transactivadora de NF- κ B. Se han descrito hasta 15 dímeros diferentes de NF- κ B, cada uno de ellos se forma en un determinado tipo de células y tras un determinado estímulo en concreto. Sin embargo, aún no ha sido demostrada la existencia y relevancia fisiológica para todos los posibles dímeros. El heterodímero p50/65 es el más abundante de los dímeros Rel, que se encuentra en casi todos los tipos de células. Además, se han descritos otros complejos como: p65/p65, p65/c-Rel, p65/p52, c-Rel/c-Rel, p52/c-Rel, p50/c-Rel, p50/p50, RelB/p50 y RelB/p52, sin embargo algunos de ellos sólo se han encontrado en un subconjunto limitado de células (Hayden & Ghosh, 2004).

III.1. Mecanismos de regulación de NF- κ B por translocación nuclear.

Se han descrito dos vías generales de activación de NF- κ B por translocación al núcleo, que son distintas no sólo en cuanto al tipo de estímulo que las inducen, sino a la composición de los dímeros y las proteínas que modulan su translocación al núcleo (**Figura 3**). La vía canónica que media la respuesta inflamatoria rápida y reversible, y la vía no canónica que está implicada en una respuesta más lenta e irreversible, propia de la diferenciación y maduración de las células del sistema inmune (Shih et al. 2011).

Vía canónica

En la ruta canónica de activación, NF- κ B es inducido principalmente por citoquinas pro-inflamatorias, moléculas asociadas a patógenos y receptores de antígenos. En las células en estado basal, las proteínas inhibidoras I κ B (I κ B α , I κ B β o I κ B ϵ) mantienen los dímeros de NF- κ B secuestrados en el citoplasma de forma inactiva. Todas las proteínas I κ B se caracterizan por la presencia de múltiples dominios de anquirina que, a través de su unión a los dímeros de NF- κ B, enmascaran su señal de localización nuclear (NLS) impidiendo de esta forma su transporte al núcleo.

En esta vía de activación de NF- κ B, la fosforilación de I κ B α por el complejo quinasa de I κ B (IKK) lleva a su ubiquitinación por las E ligasas y posterior degradación por el proteasoma. La rápida degradación de I κ B α conduce a la liberación de NF- κ B que es transportado al núcleo. Aunque la localización basal de NF- κ B

parece mayoritariamente citosólica (Ghosh & Karin, 2002), la cristalización de I κ B α unido al heterodímero p65/p50 reveló que las proteínas I κ B α cubren sólo la secuencia NLS de p65, mientras que la secuencia NLS de p50 permanece expuesta. El NLS expuesto de p50, acoplado a secuencias nucleares de exportación (NES) en I κ B α y p65, conduce a un constante transporte de los complejos de I κ B α /NF- κ B entre el núcleo y el citoplasma. La degradación de I κ B α altera drásticamente el equilibrio dinámico entre las señales de localización citosólica y nuclear para favorecer la localización nuclear.

Vía no canónica

A diferencia de la vía canónica, la vía no canónica es inducida por miembros específicos de citoquinas de la familia de TNF (tales como CD40L, BAFF y la linfotoxina- β (LT- β)). En contraste con los otros miembros de la familia, NF- κ B1 y NF- κ B2 se sintetizan como pro-formas (p105 y p100). Estas proteínas precursoras tienen la capacidad de funcionar como inhibidores de la proteína Rel, ya que pueden dimerizar a través de sus dominios RHD (Rice et al. 1992; Solan et al. 2002).

En esta vía, la activación de la quinasa inductora de NF- κ B (NIK) induce la fosforilación del complejo IKK y, por lo tanto, el posterior procesamiento proteosomal de la proteína precursora p100 hasta la región rica en glicina (GRR) para generar la subunidad p52 madura (Xiao et al. 2004; Caamaño & Hunter, 2002) (**Figura 3**). A diferencia de p100, p105 se procesa de forma constitutiva (Lin &

Ghosh, 1996). Además, p105 puede someterse a una completa degradación a través de la fosforilación de residuos de serina del extremo carboxi-terminal mediada por IKK (Cohen et al. 2004; Perkins, 2006).

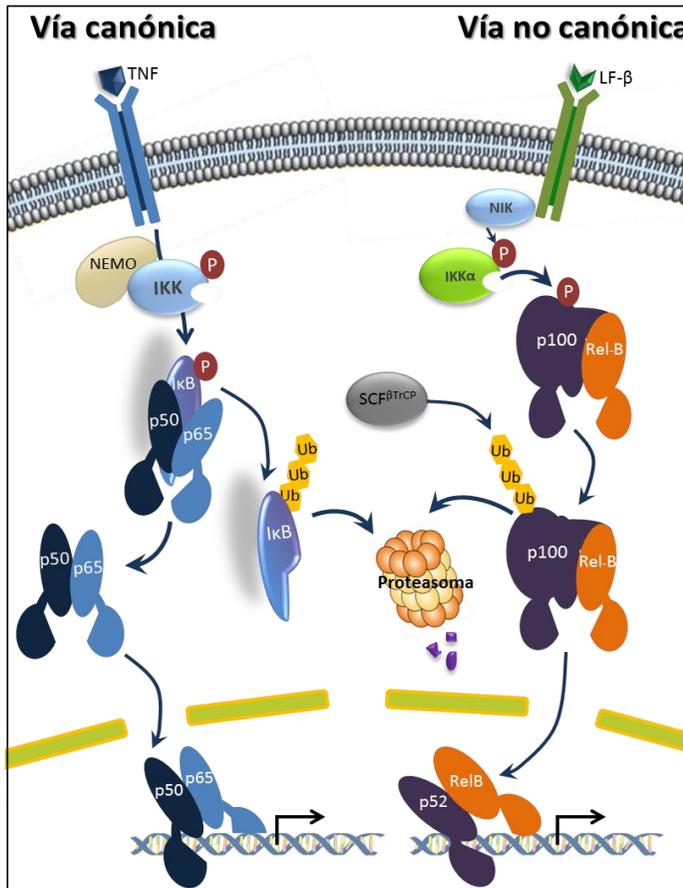


Figura 3: Vías de activación de NF-κB. Vía canónica (Izquierda): En condiciones de basales, los dímeros de NF-κB se unen a IκB, quedando retenidas de forma inactiva en el citoplasma. La degradación de las proteínas IκB se inicia a través de la fosforilación por IKK, que consta de quinasas catalíticamente activas (IKK) y la subunidad reguladora IKKγ (NEMO). Las proteínas IκB fosforilados son objeto de ubiquitinación (por SCF^{βTrCP}) y degradación proteasomal. De esta manera se liberan los dímeros de NF-κB para que puedan trasladarse al núcleo. Vía no canónica (Derecha): La activación de IKK y la fosforilación de p100 depende de NIK, IKK fosforilado media la fosforilación de p100 (asociado con RelB), esto conduce a la degradación parcial de p100 y a la generación de los complejos p52-RelB. Estos se translocan al núcleo donde son transcripcionalmente activos.

Los dímeros formados por p50 y p52, puesto que no contienen un dominio de transactivación (Marienfeld et al. 2003), actúan como represores transcripcionales (Hayden & Ghosh, 2012). Sin embargo, cuando p50 o p52 se unen a un miembro que contiene un dominio de transactivación, tal como p65 o RelB, actúan como un activador transcripcional (Hoesel & Schmid, 2013).

III.2. Mecanismos de regulación de NF- κ B por modificaciones post-traduccionales y regulación de su actividad transactivadora.

La translocación de NF- κ B al núcleo, así como su unión a los promotores de sus genes diana, no significa necesariamente que NF- κ B esté participando de forma activa en la regulación transcripcional de dicho gen. En este sentido, se han descrito varias modificaciones post-traduccionales tales como la fosforilación, la acetilación o la metilación. Estas están implicadas en la regulación de la actividad transactivadora de este factor, lo que produce el reclutamiento del coactivador CBP/p300, que induce acetilación de histonas, lo que en última instancia conduce a la transcripción de los genes (Calao et al. 2008).

Fosforilaciones en la modulación de la actividad de NF-κB.

Para que tenga lugar el reclutamiento de CBP/p300, p65 (RelA) tiene que haber sido fosforilado previamente. De hecho, se ha descrito que p65 está sujeto a fosforilaciones en distintos residuos mediados por varias quinasas (Chen & Greene, 2004) que condicionan su actividad. Por ejemplo, se ha descrito que los lipopolisacáridos de pared bacteriana y TNF α activan la proteína quinasa A (PKAc) y la quinasa activada por estrés 1 (MSK-1) respectivamente (Vermeulen L et al. 2003; Zhong et al. 1998). Estos a su vez, participan en la fosforilación de la serina 276 en el dominio RHD (Vermeulen L et al. 2003; Zhong et al. 1997; Zhong et al. 1998). Además, también se ha observado que durante el proceso de apoptosis, p53 estimula la quinasa ribosomal S6 (RSK1), lo que produce la fosforilación de la Serina 536 del dominio de transactivación de p65 (Bohuslav et al. 2004). Sin embargo, estas fosforilaciones no son suficientes para promover la unión de CBP/p300. En este sentido, se ha descrito que TNF α produce la activación de PKC- ζ , y este, a su vez, produce la fosforilación de la Ser311 de p65 (Duran et al. 2003). Se ha demostrado, a través de manipulaciones genéticas, que PKC- ζ es requerido para que NF- κ B realice su actividad transcripcional en cultivos celulares (Leitges et al. 2001). Por lo tanto, para que NF- κ B realice su función como factor transcripcional, previamente tiene que haber sido fosforilado en los residuos de serina 276, 311 y 536. Esto conlleva al reclutamiento de los coactivadores CBP/p300 al promotor. Posteriormente se produce un aumento de la acetilación de p65 y

de las histonas que rodean los genes diana para NF- κ B, y por consiguiente, la activación de la transcripción (Chen et al. 2005).

Acetilaciones en la modulación de la actividad de NF- κ B.

Otro mecanismo importante para la regulación de la actividad de NF- κ B es la acetilación reversible de p65 (RelA) (Chen et al. 2001). Tras la activación de la vía de NF- κ B por TNF α , acetato de forbol miristato (PMA) o por otros estímulos, p65 se acetila en múltiples sitios, incluyendo las lisinas 122, 123, 218, 221 y 310 (Chen et al. 2001; Kiernan et al. 2003). Las acetiltransferasa p300 y CBP parecen jugar un papel importante en la acetilación *in vivo* de p65 (Chen et al. 2002, Kiernan et al. 2003). La acetilación en residuos específicos de p65 regula las diferentes acciones biológicas del complejo de NF- κ B (Chen et al. 2004; Chen et al. 2002). Por ejemplo, la acetilación de la lisina 221 por p300/CBP aumenta la afinidad de unión de p65 al DNA. Por otro lado, la acetilación de la lisina 310 no modula la unión al DNA, pero potencia la actividad transcripcional de NF- κ B. De hecho, la desacetilación de la lisina 310 por histona desacetilasa 3 (HDAC3) o por Sirtuina 1 (SIRT1) inhibe la actividad transcripcional de NF- κ B y aumenta la apoptosis celular en respuesta a TNF α (Chen et al. 2005; Chen et al. 2002; Yeung et al. 2004).

Metilaciones en la modulación de la actividad de NF-κB.

Por otro lado, Levy y colaboradores (2011) mostraron que NF-κB también puede ser metilado en la Lys 310, teniendo un efecto sobre la actividad transcripcional de NF-κB. SETD6, una metiltransferasa de lisinas, puede añadir un grupo metilo en la Lys310 de p65 asociado a la cromatina. Se ha sugerido que la metilación de p65 podría tener un papel represivo en el control de la expresión génica en condiciones basales. De hecho, se ha observado un aumento de la transcripción de los genes dependientes de NF-κB, en condiciones basales y estimuladas, en ratones KO de SETD6. Se ha sugerido que esta metilación en la Lys 310 permite la unión de la histona metiltransferasa GLP que, a su vez, introduce metilaciones represivas en H3K9. La activación de TNFα se correlaciona con la menor abundancia de Lys310 metilada, lo que indica que la desmetilación de este residuo es un requisito previo para la expresión de los genes diana de NF-κB, bajo condiciones de activación (Levy et al. 2011). Además, al igual que ocurre con las acetilaciones, se ha descrito que las metilaciones de NF-κB están directamente relacionadas con el tipo y número de residuos fosforilados de p65. En este sentido, se ha demostrado que la fosforilación de la S311 por PKCζ (Duran et al. 2003), impide el reconocimiento y la unión de GLP, promoviendo la expresión de los genes diana de p65 (Levy et al. 2011).

IV. Papel de NF- κ B en la coordinación de distintos procesos biológicos.

Se ha demostrado que NF- κ B presenta un papel esencial en la regulación de múltiples funciones como la inflamación, proliferación, supervivencia o la apoptosis en diferentes tipos de células o incluso dentro de un mismo tejido o tipo celular dependiendo del contexto microambiental en el que se encuentre (Vermeulen K et al. 2003; Yokota & Mori, 2002).

IV.1. NF- κ B y apoptosis.

La apoptosis es un proceso fisiológico muy importante para la organogénesis, la homeostasis de tejido o para la eliminación de células defectuosas o potencialmente peligrosas para el organismo. El papel de NF- κ B en este proceso resulta algo controvertido, ya que aunque se le ha descrito como un factor que generalmente promueve la supervivencia, en determinadas circunstancias parece ser que también puede actuar como factor pro-apoptótico.

Los cinco miembros de la familia de Rel/NF- κ B, y varios componentes de sus vías de señalización, se han inactivado en ratones homocigotos para caracterizar sus funciones. Los fenotipos de dichos animales (revisado en Li & Verma, 2002) revelaron el papel de las diferentes subunidades de NF- κ B en la respuesta inmune innata y adaptativa. Sin embargo, estos estudios también pusieron de manifiesto el importante papel de NF- κ B como factor

de supervivencia en los sistemas nervioso e inmune, en el hígado, el folículo piloso y los anejos epidérmicos (Kucharczak et al. 2003). En cuanto al mecanismo por el cual NF- κ B actúa como factor de supervivencia, se ha sugerido que este modula la transactivación de genes que bloquean la muerte celular programada, tales como la proteína inhibidora de FLICE (FLIP), Bcl-XL, A1/Bfl-1, el inhibidor de la apoptosis celular (c-IAP), el inhibidor de la apoptosis ligado al cromosoma X (XIAP), el receptor de TNF α (TNFR) y los factores asociados a TNFR-1 y -2, entre otros (Dutta et al. 2006).

Como se mencionó anteriormente, aunque por lo general se ha considerado que NF- κ B promueve la supervivencia, a lo largo de los últimos años se han obtenido numerosas evidencias del destacado papel de NF- κ B como factor pro-apoptótico (Gutiérrez et al. 2008). Un claro ejemplo de ello es la activación de NF- κ B en respuesta al daño del DNA en linfocitos T. La activación de NF- κ B en dichas células inducía la expresión del ligando de FAS (FASL), promoviendo con ello la activación de la vía extrínseca de apoptosis (Kasibhatla et al. 1998). Es más, posteriormente se observó que las células T deficientes en NF- κ B eran más resistentes a la apoptosis (Teixeiro et al. 1999).

Paradójicamente, en líneas celulares de hibridoma de células T, se observó que NF- κ B podía tener efectos tanto pro-apoptóticos como anti-apoptóticos en función del tipo de estímulo. Mientras que los glucocorticoides inducían la apoptosis por inhibición de NF- κ B, la activación del receptor de las células T produce apoptosis por activación de NF- κ B y un aumento de la expresión de FasL (Lin et al. 1999). Por lo tanto, dependiendo de la señal que induce la

apoptosis, por una parte los glucocorticoides y por otra la activación del receptor de las células T, NF- κ B puede tener efectos opuestos sobre la apoptosis en un mismo tipo de células. En este mismo sentido, aunque NF- κ B previene la apoptosis en el hígado (Vainer et al. 2008), se ha demostrado que NF- κ B puede tener también un papel pro-apoptótico en líneas celulares de hepatoma. NF- κ B induce apoptosis en células de hepatoma HepG2 infectadas por el virus del Dengue (Marianneau et al. 1997). Por otro lado, la proteína core de la hepatitis C (VHC) produce un aumento de la actividad de NF- κ B e inhibe la apoptosis mediada por TNF α en la misma línea celular (Marusawa et al. 1999).

Al igual que en los otros sistemas, NF- κ B presenta un doble papel en el control de la apoptosis del sistema nervioso. Concretamente hay varios estudios que han demostrado que NF- κ B promueve la apoptosis en células neuronales *in vitro* (Clemens et al. 1998; Grilli et al. 1996). El tratamiento con glutamato en cultivos neuronales primarios de rata y cultivos de hipocampo *ex vivo*, induce un aumento de la actividad de NF- κ B y la apoptosis (Grilli et al. 1996). En modelos animales, también se ha demostrado que NF- κ B tiene un efecto pro-apoptótico. La activación del receptor NMDA de neuronas en ratas induce la translocación del complejo NF- κ B al núcleo, estimulando la apoptosis mediada por c-myc y p53 (Qin et al. 1999). Por otra parte, la inhibición de NF- κ B inducida por el tratamiento con el péptido SN50, un péptido que contiene la secuencia de localización nuclear de p50, bloquea la inducción de p53 y c-myc y por lo tanto se produce una disminución de la

apoptosis, proporcionando protección contra la muerte celular neuronal (Lin et al. 1995).

Otro modelo en el que se ha descrito este doble papel de NF- κ B, es en la glándula mamaria durante el ciclo de embarazo/lactancia. Este factor transcripcional se expresa y está activo a lo largo de las diferentes etapas del desarrollo de la glándula mamaria. Durante la involución de la glándula tras el destete de las crías, la actividad de NF- κ B aumenta significativamente (Clarkson et al. 2000; Zaragoza et al. 2010). Este aumento de la actividad de NF- κ B coincide con el período en el que las células epiteliales lumbinales mueren por apoptosis. Según algunos autores, NF- κ B desempeña principalmente un papel pro-supervivencia a través de la regulación transcripcional de un número de proteínas anti-apoptóticas, incluyendo IAP y Bcl-2 (Karin & Ben-Neriah, 2000) lo que sugiere que NF- κ B tiene un papel protector en la involución de la mama. Por el contrario, otros hallazgos han descrito que un aumento de la actividad de NF- κ B en ratones condicionales que expresan de forma constitutiva IKK β , se correlaciona con un incremento de la caspasa 3 activa durante la involución, favoreciendo la apoptosis y el remodelado de la glándula mamaria (Connelly et al. 2010). Además, se ha demostrado que NF- κ B y la quinasa IKK2, promueven la activación de la vía extrínseca de apoptosis durante la involución. NF- κ B se requiere al principio de la involución para la expresión de diferentes ligandos como el factor de necrosis tumoral (TNF), TWEAK y el receptor de muerte TNFR1 (Baxter et al. 2006). La interacción de estos ligandos con TNFR1 da como resultado la activación de la cascada de caspasas, y por lo tanto la apoptosis.

Todos estos datos ponen de manifiesto la necesidad de una investigación exhaustiva que ayude a comprender los complejos mecanismos que subyacen, no sólo a la vía de activación de NF- κ B sino, más importante aún, al output final que determinará en última instancia la supervivencia o la muerte celular. Aunque hasta la fecha se desconocen por completo los mecanismos mediante los cuales NF- κ B puede presentar una función dual durante la apoptosis, la identificación de los genes regulados por NF- κ B *in vivo*, así como el conocimiento de las señales adicionales que regulan estos genes, ayudaría a la comprensión de aquellos procesos dirigidos por NF- κ B.

IV.2. NF- κ B y proliferación.

El papel del factor transcripcional NF- κ B en la proliferación y el control del ciclo celular también resulta muy controvertido. NF- κ B está implicado en la regulación de la expresión de las ciclinas D1, D2, D3 y de la ciclina E y, por tanto, en la progresión del ciclo celular (Guttridge et al. 1999; Hinz et al. 1999 & 2001; Hsia et al. 2002). En apoyo de su destacado papel durante la proliferación, se ha observado que las células B de ratones c-Rel $-/-$ o doble KO para NF- κ B1 y c-rel presentan una respuesta proliferativa defectuosa tras la estimulación mitogénica, resultando en una parada del ciclo celular en la fase G1 (Köntgen et al. 1995; Hsia et al. 2002; Pohl et al. 2002). Hsia y colaboradores (2002) observaron que las células B deficientes en c-Rel presentaban un defecto en la proliferación

debido a la falta de la expresión de las ciclinas D3 y E. Además, el mismo grupo sugirió que c-Rel posiblemente participe en la transactivación de la ciclina E a través de la expresión del factor de transcripción E2F3a (Cheng et al. 2003). Por otra parte, se ha descrito que NF- κ B puede interactuar con el complejo ciclina E/Cdk2 o con el inhibidor de quinasa dependiente de ciclina p16INK4 a través de los coactivadores p300 y CBP, esto ofrece un mecanismo para la coordinación de la activación de la transcripción con la progresión del ciclo celular (Perkins et al. 1997; Wolff & Naumann, 1999).

Por el contrario, se ha observado que NF- κ B es capaz de inhibir la proliferación celular. NF- κ B media la inducción del inhibidor del ciclo celular p21/Waf1 en queratinocitos (van Hogerlinden et al. 1999; Seitz et al. 2000; Hinata et al. 2003). Esto está en concordancia con estudios previos que muestran que la sobreexpresión de c-Rel detiene la proliferación en la línea celular HeLa, coincidiendo con la estabilización de p53 y la inducción de p21/WAF1 (Bash et al. 1997).

Al igual que en el caso anterior, aunque en los últimos años se ha hecho un gran esfuerzo por dilucidar los mecanismos moleculares que gobiernan las acciones antiproliferativas o proliferativas de NF- κ B, la información disponible deja todavía muchas preguntas sin respuesta.

IV.3. NF-κB e inflamación.

El factor de transcripción NF-κB participa en la regulación de la expresión de genes implicados en la inflamación. Citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 1 (IL-1), TNFα, etc, son capaces de estimular diferentes receptores de superficie celular para iniciar una cascada de señalización que resulta en la activación de NF-κB. Este, a su vez, favorece la expresión de genes diana que median la proliferación celular y la liberación de citoquinas y moléculas antimicrobianas para activar la respuesta inmune (Hayden & Ghosh, 2008). Aunque NF-κB se caracterizó por primera vez en las células del sistema hematopoyético, la investigación posterior ha demostrado que la activación de NF-κB puede ocurrir en la mayoría de tipos celulares. De hecho, cada vez hay más trabajos que demuestran un papel clave de la vía de señalización de NF-κB en la inflamación del hígado, del tejido adiposo, del sistema nervioso central, en el desarrollo de la inflamación asociada a enfermedades metabólicas, etc. Además desempeña un papel fundamental durante la involución de la glándula mamaria (Zaragozá et al. 2010).

NF-κB juega un papel esencial en la regulación de las vías de señalización implicadas en la inflamación del hígado. Por un lado, NF-κB se activa en prácticamente todas las enfermedades hepáticas crónicas, como la esteatosis hepática alcohólica y no alcohólica, la hepatitis viral y colestasis (Reddy & Rao, 2006; Mandrekar & Szabo, 2009; Videla et al. 2009; Hösel et al. 2009; Boya et al. 2001; Tai et al. 2000; Kusters & Karpen, 2010). Por otro lado, este factor

transcripcional regula varias funciones esenciales en los hepatocitos, en las células de Kupffer y en las células estelares hepáticas (HSC). Además, su inactivación da como resultado fenotipos que incluyen lesiones hepáticas, fibrosis y carcinogénesis. Esto sugiere que NF- κ B tiene un papel esencial en la homeostasis del hígado (Luedde et al. 2007; Luedde et al. 2008; Bettermann et al. 2010; Inokuchi et al. 2010).

Además NF- κ B desempeña un importante papel en la inflamación que tiene lugar durante la involución de la glándula mamaria. Además de regular la expresión del gen de la iNOS, se ha descrito que NF- κ B actúa como factor transcripcional para diferentes citoquinas pro-inflamatorias, tales como IL-1, IL-6 e IL-8 (Karin & Ben-Neriah, 2000). Además, NF- κ B puede tener un papel importante en la infiltración de neutrófilos, fagocitos y células *Natural killer* (NK) en la glándula mamaria durante la involución, necesaria para la eliminación de las células epiteliales lumbinales apoptóticas.

V. Id2 como nodo de regulación transcripcional.

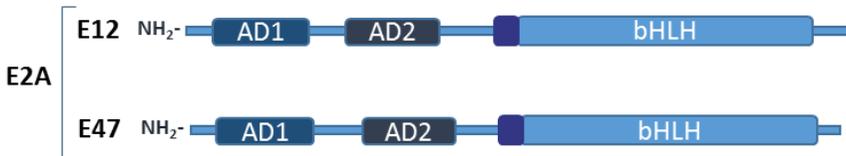
La proteína Id2, al igual que se ha descrito para NF- κ B, es otro componente con funciones pleiotrópicas que podría ser un nodo crítico de regulación de las redes transcripcionales y de coordinación de los distintos procesos biológicos en los que se ha visto involucrado. Aunque en un principio se pensó que Id2 estaba implicado en funciones relacionadas con la diferenciación celular y el desarrollo, en los últimos años, se ha descrito su importante papel en la regulación de otros procesos biológicos (Benezra et al. 1990). En este sentido, se ha visto que Id2 participa en la regulación y coordinación de la proliferación celular, el control del ciclo celular, la senescencia, la apoptosis y la angiogénesis. Además, id2 está implicado en diversas situaciones patológicas como el cáncer y la metástasis. (Norton, 2000; Lasorella et al. 2001; Zebedee & hara, 2001; Lasorella et al. 2014).

Id2 pertenece a la familia de proteínas Helice-lazo-Hélice (HLH) identificadas hace más de tres décadas por su doble papel como inhibidores de la diferenciación e inhibidores de la unión al DNA. Las proteínas Id se descubrieron inicialmente en un intento de identificación de los factores de transcripción que pertenecen a la familia de factores HLH con una región adyacente rica en aminoácidos básicos (bHLH). Paradójicamente, las proteínas Id carecen de dicha región que es esencial para la unión específica al DNA (Benezra et al. 1990). Este dominio básico se une a la secuencia de 6 nucleótidos “CANNTG” de la caja E del promotor de los genes diana (Murre et al. 1989) (**Figura 4b**).

Las proteínas HLH se clasifican en siete grupos de acuerdo a su motivo de unión al DNA. Las siete clases de proteínas HLH comparten dos hélices anfipáticas altamente conservadas, que quedan conectadas por un bucle de secuencia y longitud variable. La Clase I (o clase A) de proteínas bHLH también se conocen como las proteínas E, ya que proceden del *splicing* alternativo del gen EA2. Este grupo incluye proteínas que se expresan de forma ubicua. La Clase II (o clase B) de proteínas bHLH incluye miembros tales como MyoD, NeuroD, o Hes con un patrón de expresión específico de tejido. Las proteínas de Clase I y II pueden formar homodímeros o heterodímeros que regulan gran cantidad de procesos durante el desarrollo (Massari & Murre, 2000). Las proteínas Id pertenecen a la Clase V de factores HLH que incluye cuatro miembros que van de Id1 a Id4 (Benezra et al. 1990; Murre et al. 1989; Massari & Murre, 2000). Las proteínas Id pueden dimerizar con cualquiera de las proteínas de Clase I o II pero, ya que no contienen el motivo de unión al DNA, la unión de estas con los factores de transcripción bloquea su actividad de una manera dominante negativa (Benezra et al. 1990). Por lo tanto, aquellos procesos del desarrollo modulados por factores de Clase I y II podrían quedar bloqueados por las proteínas Id (Kim et al. 2012; Yokota et al. 1999; Chen et al. 2012; Iavarone et al. 2004) (**Figura 4**).

A) Familia bHLH

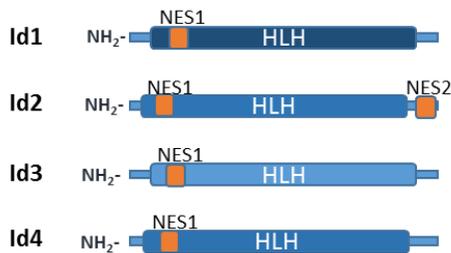
Clase I o proteínas E



Clase II



Clase V



B)

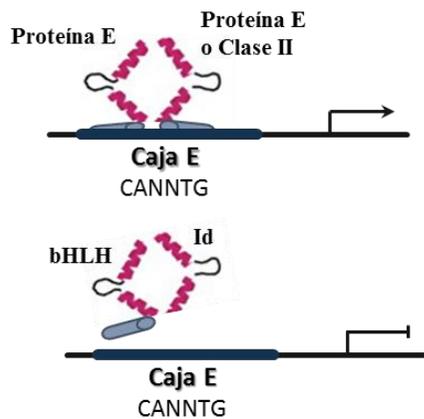


Figura 4. Representación esquemática de algunos miembros de la familia de proteínas bHLH. A) Se representan diferentes miembros de la clase I, II y V y sus dominios estructurales mas importantes. (H/C) región rica en histidina y cisteínas; (bHLH) dominio básico hélice-bucle-hélice; (HLH) dominio hélice-bucle-hélice; (AD) dominio de activación de la transcripción; (NES) señal de exportación nuclear. **B)** Dimerización de factores de transcripción de la familia bHLH por interacción entre dominios HLH. Los dímeros bHLH reconocen la caja E en promotores génicos a través de su dominio de unión al DNA rico en aminoácidos básicos (parte superior). Las proteínas Id, sin dominio básico de unión al DNA, actúan como dominantes negativos de los factores bHLH mediante heterodimerización con estos (parte inferior).

V.1. Mecanismos de regulación de la actividad y de la función de Id2.

En la literatura se describe a Id2 como una proteína reguladora, cuya función es altamente dependiente del microambiente celular y su mecanismo de acción molecular es mucho más complejo de lo que se pensaba en un primer momento. Se conoce que Id2 puede ser regulado a varios niveles: a nivel transcripcional y a nivel postraduccional, variando la estabilidad de la proteína o su localización subcelular.

V.1.1. Modulación de los niveles de expresión de Id2.

Los niveles de expresión de Id2 se han descrito clásicamente como un punto clave para determinar su función. Por lo general, la expresión de Id2 es alta durante la proliferación celular y baja, o casi ausente, en las células quiescentes, tales como las células diferenciadas. Sin embargo, Id2 es una proteína pleiotrópica involucrada en muchas otras funciones distintas de la proliferación celular. El agotamiento de glutatión (GSH) por L-butionina sulfoximina (BSO) induce la expresión Id2 a través de c-Myc (Torres et al. 2009). Por el contrario, TGF- β (una citoquina citostática cuya función es altamente dependiente del microambiente), la cual también disminuye la concentración de GSH en una amplia variedad de tipos celulares (Liu & Gaston Pravia, 2010), reprime la expresión de Id2 en células epiteliales a través de la modulación de

c-Myc en células epiteliales (Siegel et al. 2003). Sin embargo, TGF- β induce un aumento de la expresión de Id2 en las células dendríticas (Hacker et al. 2003). Los glucocorticoides, el ayuno, los agentes antidiabéticos, los receptores activados por los proliferadores de peroxisomas (PPAR), los agonistas gamma, o los miembros de la familia HDAC, incluyendo HDAC1-8 (Zilberfarb et al. 2001; González Mdel et al. 2012; Chen et al. 2012) son algunos de los muchos ejemplos que inhiben la expresión de Id2 en diferentes líneas celulares. Además, estas señales pueden estar conectadas y coordinadas. Por otro lado, se han descrito diferentes factores, tales como la glucosa, el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), los estrógenos, la progesterona, la hormona de la tiroides o el factor inducible por hipoxia 1 α (HIF-1 α), que puede activar la expresión de Id2 (Grønning et al. 2006; Chen et al. 2012).

V.1.2. Modulación de la estabilidad proteica.

Los niveles de Id2 no sólo están sometidos a un control transcripcional, sino que también pueden modularse a nivel postraducciona, afectando a la estabilidad proteica. En este sentido, Id2 está sometida a un rápido recambio proteico, con una vida media de 20 a 60 minutos dependiendo del tipo celular (Deed et al. 1996; Bounpheng et al. 1999).

En tejidos diferenciados, las proteínas Id se ubiquitinan y se degradan vía proteasoma. Se ha descrito que el complejo APC/Cdh1

añade grupos ubiquitina en la lisina 48 de Id1, Id2 e Id3, posteriormente, estas proteínas son degradadas en el proteasoma 26S. Las enzimas deubiquitininas (DUBs) se encargan de eliminar los grupos ubiquitina, aumentando la vida media de las proteínas sobre las que actúan, evitando su degradación (Wilkinson, 1997; Eletr & Wilkinson, 2014). Recientemente, se han identificado hasta 10 DUBs distintas capaces de aumentar la estabilidad proteica de Id2 endógeno en células T293. Sin embargo, solo se ha demostrado que la deubiquitinasa USP1 es capaz de hacerlo de forma directa. En estos experimentos, Williams y colaboradores demuestran el destacado papel de USP1 sobre la estabilidad de Id2 y las consecuencias que ello desencadena sobre la proliferación o la diferenciación celular. La expresión ectópica de USP1 en células madre mesenquimales estabiliza a las proteínas Id, inhibe la diferenciación osteoblástica y aumenta la proliferación celular. En células de osteosarcoma KO de USP1, se produce una desestabilización de las proteínas Id, la inducción de CDKN1A (precursor de p21) y la parada del ciclo celular. La vida media de Id2 en las células de osteosarcoma es de alrededor de dos minutos, sin embargo cuando USP1 se sobre-expresa aumenta su vida media hasta los 80 minutos (Williams et al. 2011) (**Figura 5**).

La estabilización de Id2 por USP1 parece estar sometida además, a un nivel adicional de regulación. Recientemente se ha descrito que la subunidad reguladora de la proteasa calpaína (CAPNS1 o calpaína 4) estabiliza a USP1 en células de osteosarcoma U2OS. La eliminación de CAPNS1 con siRNA provoca la desestabilización y degradación de Id2 (Cataldo et al. 2013). En

cualquier caso, el papel de USP1 sobre la estabilidad de Id2 solo se ha demostrado en cultivos celulares y en un modelo patológico *in vivo*, en osteosarcoma (Williams et al. 2011).

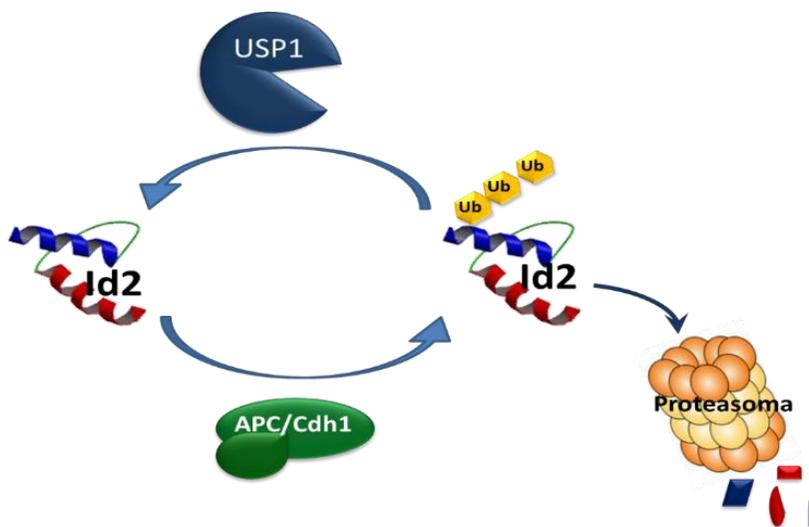


Figura 5: Modulación de la estabilidad de Id2. La proteína Id2 se ubiquitina por el complejo APC/Cdh1 y se degrada vía proteasoma. La desubiquitinasa USP1, mediante la eliminación de estos grupos de ubiquitina, aumenta la vida media de Id2.

V.1.3. Fosforilación de Id2 y distribución subcelular.

A pesar de la indudable importancia de los niveles de Id2 sobre la función de esta proteína, los mecanismos de regulación de la transcripción o de la estabilidad de Id2 no explican el control de la actividad de Id2. De hecho, podemos encontrar publicaciones en las que se describe el papel de Id2 en el control de la diferenciación de oligodendrocitos sin que sus niveles de proteína cambien sustancialmente (Wang et al. 2001).

Un importante mecanismo propuesto para explicar la regulación de la actividad de Id2 es la fosforilación de algunos residuos específicos. En las proteínas Id2, cerca del dominio amino-terminal existe un sitio de fosforilación para quinasas de tipo CDK (acrónimo del inglés cyclin dependent kinases). Este sitio, que se encuentra conservado entre los diferentes miembros de la familia de proteínas Id, contiene la secuencia consenso para los sustratos de las CDKs (S/T-P-X-K/R) (Nagata et al. 1995). De hecho, se ha demostrado que los complejos ciclina A/E/CDK2 fosforilan Id2 en la Ser5 que está incluida en dicha secuencia. Esta fosforilación previene la unión de Id2 a algunos factores bHLH y bloquea su actividad en fibroblastos humanos estimulados con suero (Butler et al. 2009). Por lo tanto, sería razonable pensar que las diferentes funciones de Id2 podrían ser dependientes del tipo o número de residuos fosforilados por quinasas específicas que podrían condicionar su interacción con otras proteínas. En este sentido, se ha sugerido una posible relación entre la proliferación celular y el estado de fosforilación de Id2 e interacción con bHLH. La sustitución de la Ser5 de Id2 por Ala (Id2-S5A) en células de músculo liso previene la fosforilación de Id2 permitiendo su interacción con MyoD, un factor de la familia bHLH. En estos experimentos con Id2-S5A se observa una reducción del 50% en la formación de colonias (Butler et al. 2009).

Pero las funciones de Id2 no están necesariamente condicionadas por su unión a factores bHLH. Un trabajo reciente sugiere que la fosforilación de la Ser5 de Id2 por CDK2 es necesaria para que Id2 interactúe con factores que permitan su

translocación al núcleo, tales como E47 (Hara et al. 1997). En células de músculo liso con la forma mutada Id2-S5A, se comprobó que la distribución subcelular de Id2 sin fosforilar difiere de la de Id2 fosforilado. Los resultados mostraron que Id2 tiene una localización predominantemente nuclear, mientras que Id2-S5A se restringe al citosol (Butler et al. 2009).

La distribución subcelular es uno de los puntos más importantes para la regulación de la actividad y función de Id2. Durante la diferenciación de las células precursoras de oligodendrocitos (OPC) a oligodendrocitos, los niveles de proteína de Id2 son similares. Sin embargo, la distribución subcelular de Id2 varía significativamente. Mientras que en células OPC desdiferenciadas, Id2 se localiza en el núcleo, en los oligodendrocitos completamente diferenciados, Id2 se localiza en el citosol (Wang et al. 2001). Los autores muestran que para que tenga lugar la diferenciación de los oligodendrocitos, Id2 necesita ser translocado desde el núcleo al citosol.

Id2 contiene dos señales de exportación nuclear, NES1 y NES2, en el dominio HLH y en el dominio C-terminal, respectivamente. La NES1 está conservada en todos los miembros de la familia Id, y la NES2 se ha visto que es específica de Id2 (Makita et al. 2006). Aunque el transporte entre el núcleo y el citosol se había propuesto que podía ser por difusión pasiva (Kurooka & Yokota, 2005), los datos recientes señalan que también hay un transporte activo de Id2. La exportación desde el núcleo está mediada por la NES2. Sin embargo, Id2 no contiene una señal NLS, por lo que su

translocación desde el citosol al núcleo debe estar mediado por su interacción con una proteína que contenga secuencias NLS. Por otra parte, este mecanismo de importación de Id2 al núcleo no se conoce del todo bien. Aunque ya se ha descrito para Id2/E47 (Matsumura et al. 2002), puesto que Id2 es una proteína pleiotrópica que puede unirse a un amplio espectro de proteínas distintas, otros factores inducidos durante la proliferación o la diferenciación celular podrían unirse a Id2 para facilitar o prevenir su transporte al núcleo.

VI. Papel de Id2 en la coordinación de distintos procesos biológicos.

Al igual que NF- κ B, Id2 también se ha visto implicado en numerosas funciones biológicas. En este sentido, se ha visto que Id2 participa en la regulación y coordinación de la proliferación celular, la diferenciación celular y el desarrollo, el control del ciclo celular o la apoptosis (Benezra et al. 1990; Norton, 2000; Lasorella et al. 2001; Zebedee & Hara, 2001; Lasorella et al. 2014).

VI.1. Id2 y apoptosis.

Como se ha mencionado anteriormente, los niveles de proteínas Id son altos durante la proliferación y disminuyen antes del inicio de la diferenciación terminal en muchos tipos de células (Benezra et al. 1999; Liu et al. 2000; Hua & Sarvetnick, 2007). Sin embargo, la sobreexpresión de Id2 también se ha visto relacionada con apoptosis en diferentes líneas celulares (Yokota & Mori, 2002). Un claro ejemplo de ello es lo que ocurre en las células progenitoras mieloides 32D.3, donde la sobreexpresión de Id2 es capaz de inducir apoptosis mediante el aumento de los niveles de BAX. Además, en células transfectadas con plásmidos de expresión de Id2 con deleciones en diferentes regiones, se observó que la apoptosis mediada por Id2 es independiente de la dimerización con factores bHLH (Florio et al. 1998). El mismo mecanismo se ha propuesto para la muerte por apoptosis de células neuronales *in vivo* e *in vitro*, donde también se ha descrito un aumento de los

niveles de Id2 y de BAX (Guo et al. 2013). Por otra parte, se ha observado un aumento de los niveles de Id2 en el músculo esquelético de roedores con edad avanzada, que se correlaciona positivamente con un incremento de los niveles de proteínas pro-apoptóticas como BAX y caspasa 9 (Alway et al. 2002).

Si la apoptosis mediada por Id2 no depende de su interacción con factores bHLH, la interacción con otras proteínas y su localización subcelular podría ser determinante para su función en los procesos de muerte celular. Esta hipótesis se ha sugerido como mecanismo de la apoptosis mediada por Id2 en el músculo esquelético (Siu & Alway, 2005; Siu et al. 2006). De hecho los niveles de Id2 citoplasmáticos son elevados durante las condiciones de atrofia en el músculo esquelético, y se correlacionan positivamente con proteínas asociadas con la vía intrínseca de muerte celular (Siu & Alway, 2005; Siu et al. 2006). Es más, se ha demostrado que un aumento de la expresión de Id2 con una mutación en la serina 5 se restringe al citoplasma de mioblastos, puesto que no puede ser fosforilado. Esta retención de Id2 en el citoplasma da lugar a un aumento en varios marcadores de apoptosis, incluyendo Anexina V, TUNEL, caspasa 3 y caspasa 8 (Butler et al. 2009). En este mismo sentido, se ha descrito que la fosforilación de Id2 en la Serina 5 produce la retención de Id2 en los núcleos mediante la prevención de la exportación, inhibiendo la apoptosis en células epiteliales de glándula mamaria durante el embarazo (Kim et al. 2011).

En condiciones patológicas, el efecto de agotamiento de GSH sobre la regulación de Id2 es bastante diferente. Anteriormente se

ha comentado que una depleción de GSH por BSO induce la expresión Id2 a través de c-Myc. Sin embargo, se ha descrito que tras el agotamiento de GSH que tiene lugar en respuesta a la toxicidad por exceso de acetaminofeno (APAP), hay una disminución transcripcional de Id2 en el hígado, lo que en última instancia conduce a la muerte celular (Penella et al. 2010). Todo esto indica que Id2 podría tener un importante papel en la regulación de las vías de supervivencia activadas en modelos experimentales con importantes fluctuaciones del contenido de GSH.

VI.2. Id2 y proliferación.

Hay un número creciente de evidencias derivadas de experimentos *in vitro* e *in vivo* que apoyan la importancia de Id2 durante la proliferación celular. En este sentido, se ha observado que la sobreexpresión ectópica de Id2 aumenta la proliferación en diferentes tipos de células (Iavarone et al. 1994; Trabosh et al. 2009; Wang et al. 2012). Además, Id2 está sobreexpresado en diferentes tipos de cánceres como el de páncreas, neuroblastoma o en carcinoma de colon. El silenciamiento parcial de Id2 con oligonucleótidos antisentido en estos tumores disminuye la proliferación celular (Lasorella et al. 2000). Como consecuencia, Id2 se ha propuesto como un factor de pronóstico y un objetivo terapéutico potencial para el tratamiento del cáncer (Lasorella et al. 2000; Fong et al. 2004).

Desde el punto de vista clásico, se pensó que el papel de Id2 como factor proliferativo dependía sólo de su capacidad para dimerizar con proteínas bHLH actuando como un factor dominante negativo (**Figura 6**). En este modelo, Id2 podría controlar la proliferación celular reprimiendo la expresión de inhibidores del ciclo celular como p21^{Cip1} o p57^{Kip2}. De hecho, la sobreexpresión de Id2 es capaz de revertir la parada del ciclo celular inducida por p57^{Kip2} y p21^{Cip1} (Matsumura et al. 2002; Rothschild et al. 2006). La expresión de estos inhibidores de CDKs (CDKI) está regulada por factores de transcripción bHLH y la formación de heterodímeros bHLH/Id2 reprime la expresión de CDKI, activando las CDKs.

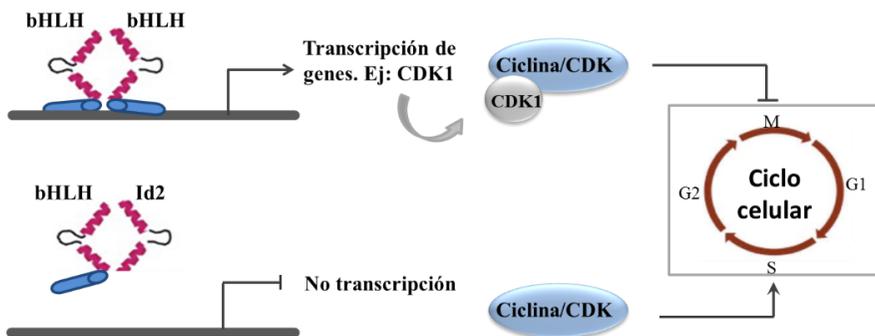


Figura 6: Modelo de Id2 como factor dominante negativo para el control del ciclo celular. (Arriba) Las proteínas de la familia bHLH dimerizan y se unen al promotor de genes *cdki*, activando su transcripción. CDKI se une al complejo ciclina/CDK y bloqueando su actividad, induce la parada del ciclo celular. (Abajo) Dimerización de las proteínas bHLH con Id2. Id2 secuestra factores bHLH impidiendo la unión de estos al promotor de *cdki*. La transcripción de los genes CDKI se inhibe. El complejo ciclina/CDK permanece activo y el ciclo celular puede progresar.

Más tarde se demostró que Id2 podía unirse a otras proteínas diferentes de los factores bHLH, como el supresor tumoral pRb y las proteínas de la familia de pRb, las *pocket* proteins p130 y p107 (RB: familia de pRb y las *pocket* proteins) (Lasorella et al. 2000). Se sabe que las proteínas RB se unen directamente a E2F en los promotores regulados por este factor para restringir la expresión de genes relacionados con el ciclo celular (Chen et al. 2009). Por lo tanto, Id2 podría estar relacionado con los genes diana de E2F.

A pesar de que todas las proteínas RB se unen a E2F y están moduladas por un mecanismo dependiente del ciclo celular, su patrón de expresión es diferente. Mientras que p130 se une preferentemente a E2F4/5 y es más abundante en las células quiescentes, p107 se expresa principalmente durante la proliferación celular. La proteína p130 inhibe la actividad transcripcional de E2F4/5 mediante dos mecanismos diferentes; por un lado se une al dominio de transactivación de E2F, inhibiendo su función y, por otro lado, recluta correpresores como la DNA metiltransferasa 1 (DNMT1) o los complejos HDAC. Esto conduce a la compactación de la cromatina y la inhibición de la transcripción de los genes necesarios para la entrada en la fase S del ciclo celular. Sin embargo, la fosforilación de las proteínas RB por complejos específicos ciclina/CDK hace que se puedan expresar los genes dependientes de E2F garantizando la progresión de las células a través del ciclo celular (**Figura 7**).

En este contexto es donde Id2 puede tener un papel más relevante en el control de la proliferación celular. Esto es porque, de manera regulada por el ciclo celular, Id2 puede unirse a las

pocket proteins de la familia RB (Lasorella et al. 2000). Es importante destacar que Id2 es el único miembro de la familia de proteínas Id que puede unirse a las proteínas RB hipofosforiladas. Además, se ha demostrado que Id2 altera la actividad supresora del crecimiento de RB hipofosforilado (Iavarone et al. 1994; Lasorella et al. 2000).

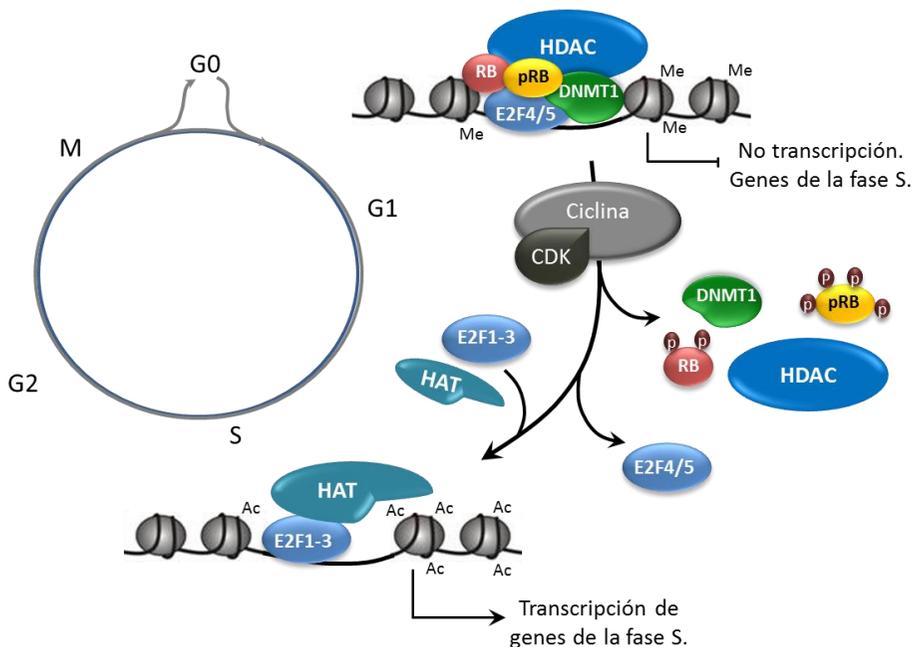


Figura 7. Control del ciclo celular por los genes diana de E2F. En la fase G0, E2F4/5 se asocia a proteínas RB (pRB y pocket proteins) y co-represores (HDAC y DNMT1). Los genes diana de E2F se reprimen. Tras un estímulo mitogénico, en la fase G1, los complejos ciclina D/CDK4-6 y ciclina E-A/CDK2 fosforilan proteínas de unión a Rb y RB. La fosforilación de estas proteínas provoca la liberación de los co-represores del resto del complejo. Al mismo tiempo, la hiperfosforilación de RB provoca la pérdida de su función y con ello, su liberación del promotor. Esto permite el acceso de las HAT a los promotores de estos genes. Al final de la fase G1, las proteínas E2F1, 2 y 3 recién sintetizadas, sustituyen a E2F4/5 en los promotores. Estos procesos permiten la activación de la transcripción en los genes regulados por E2F y conducen a la célula a la fase S.

El estudio del patrón de expresión de Id2 después de un estímulo mitogénico sugiere diferentes funciones para esta proteína durante la progresión del ciclo celular. El primer pico de expresión de Id2 tiene lugar durante la transición G0-G1 (Zebedee & Hara, 2001). Id2 podría tener un papel en la modulación de la actividad del complejo p130-E2F4/5 y en el “priming” que se produce durante esta fase del ciclo celular. El segundo pico de expresión de Id2 tiene lugar en la fase G1 tardía, donde podría alterar la actividad represora de p107 y/o pRb facilitando la entrada en la fase S.

VI.3. Id2, desarrollo y diferenciación.

Como se ha descrito anteriormente, las proteínas Id se han considerado como factores de inhibición de la diferenciación celular y al mismo tiempo activadores de la proliferación celular. De hecho, la expresión de las proteínas Id es más alta en poblaciones celulares que todavía no se han diferenciado, disminuyendo sus niveles en células que salen del ciclo celular y entran en la etapa de diferenciación terminal (Norton et al. 1998). Sin embargo, ahora está claro que, dependiendo de la línea celular y de la etapa de desarrollo, algunas proteínas Id pueden actuar ya sea como reguladores negativos o positivos de la diferenciación y la proliferación.

Por ejemplo, se sabe que las proteínas de la familia Id participan en la especificación del destino celular de las células de

la cresta neural. Se ha sugerido que los heterodímeros Id2 pueden mantener el equilibrio entre la diferenciación y la proliferación en la cresta ectodérmica y en los precursores neuronales. Mediante el uso de retrovirus recombinantes, se ha demostrado que la expresión ectópica de Id2 produce la especificación de células ectodérmicas a células que forman la cresta neural. Además, la sobreexpresión de Id2 resulta en un crecimiento excesivo y la neurogénesis prematura del tubo neural (Yokota, 2001; Martinsen & Bronner-Fraser, 1998). Por otro lado se ha descrito que la proteína Id2 inhibe la maduración de las células precursoras oligodendrogiales, bloqueando directamente la actividad del factor de transcripción bHLH, Olig2 (Havrda et al. 2014).

Otro claro ejemplo del papel de Id2 en la diferenciación es el que ocurre con las células NK. En ratones KO de Id2 se ha observado una clara disminución de las poblaciones de células NK en el bazo, el timo, el hígado y en la médula ósea, lo que demuestra que Id2 tiene un papel esencial en la generación de los órganos linfoides periféricos (Yokota et al. 1999; Ikawa et al. 2001).

El papel de Id2 en el desarrollo y diferenciación ha sido ampliamente estudiado en glándula mamaria de ratones KO y *wild type* de Id2. Incluso en ausencia de Id2, la glándula mamaria se forma durante la embriogénesis y se desarrolla normalmente en el período de la adolescencia (Mori et al. 2000). Sin embargo, durante el periodo de gestación, en los ratones KO de Id2 no se produce la expansión del tejido secretor. Dado que generalmente, los niveles de expresión de Id2 alcanzan su nivel máximo en el período gestacional, se ha sugerido que Id2 es imprescindible para la

proliferación de las células del tejido secretor al final de la gestación (Mori et al. 2000). Además, los ratones KO de Id2 presentan un defecto en la glándula mamaria durante la lactancia. Las crías nacidas de madres KO para Id2 nunca sobreviven y mueren a los dos días con una deshidratación severa y sin haber ingerido ningún tipo de alimento (Mori et al. 2000). Parece ser que una función importante de Id2 en el desarrollo de la glándula mamaria es la estimulación del ciclo celular. De hecho, se ha descrito que las células epiteliales KO de Id2 de glándula mamaria muestran unos niveles elevados de inhibidores de la quinasas dependientes de ciclina p27^{Kip1} y p21^{WAF1} (Mori et al. 2000). Estas observaciones sugieren que el aumento de la expresión de los CDKIs disminuye la proliferación celular en ratones KO de Id2 durante el periodo gestacional.

Puesto que parece ser que Id2 favorece la proliferación de las células epiteliales de la glándula mamaria y no su diferenciación, el tejido debería mostrar una diferenciación prematura. Sin embargo, en los ratones KO de Id2, las células epiteliales mamarias no muestran signos de diferenciación prematura, sino que permanecen en un estado inmaduro. Un indicativo de ello es que estas células no expresan genes característicos de las células epiteliales completamente diferenciadas como los genes que codifican proteínas de la leche, como β -caseína (Mori et al. 2000).

VII. Modelos fisiológicos de confluencia y coordinación de señales.

Como se ha mencionado con anterioridad, el estudio de la regulación de la expresión génica y las redes transcripcionales se complica cuando en un mismo tejido o modelo fisiológico tienen lugar diferentes procesos biológicos de forma simultánea. Con frecuencia, los estudios sobre el papel de inputs específicos, como son NF- κ B o Id2, sobre la regulación de las redes transcripcionales se lleva a cabo en modelos experimentales *in vitro*. En dichos modelos, difícilmente confluyen la serie de señales que deberán coordinarse para dar lugar al output final que se observa *in vivo*. Además, se suelen utilizar líneas celulares transformadas que posiblemente reflejen más las necesidades del cultivo celular que las necesidades celulares *in vivo*. Por otra parte, los estudios realizados *in vivo* se abordan sobre-expresando la proteína que será objeto de estudio, utilizando modelos animales *knockout* para la proteína o algún componente de su vía de señalización o incluso en tumores en los que los posibles nodos de regulación transcripcional se encuentran desregulados. Estos aspectos son especialmente relevantes cuando se estudian nodos de regulación transcripcional que están constituidos por proteínas de funciones pleiotrópicas como NF- κ B e Id2. La modulación de la abundancia, localización subcelular y actividad de estas proteínas está sometida a un estrecho control, restringida a un tiempo muy preciso y coordinada con la expresión de otras proteínas con las que pueden interactuar. En otras palabras, dependerá del microambiente

celular y por tanto, la elección del modelo en el que se estudiarán los distintos nodos de regulación no constituye una cuestión baladí.

Entre los distintos modelos fisiológicos en los que confluyen varios procesos biológicos de forma simultánea y en los que NF- κ B o Id2 parecen jugar un papel destacado, están la glándula mamaria en involución tras el destete forzado de las crías y la regeneración hepática tras la hepatectomía parcial (PHx):

- La involución post-lactancia es un modelo complejo en el que cooperan diferentes señales, no sólo al inicio de la muerte celular con el fin de eliminar las células epiteliales productoras de leche, sino también estimulan la afluencia controlada de los macrófagos y otros tipos de células inmunes para eliminar las células muertas y la leche residual. Además, estos eventos coinciden con la ruptura controlada de la matriz extracelular, la remodelación de los vasos sanguíneos, así como una re-diferenciación de los adipocitos (Watson, 2011).
- La regeneración hepática tras la PHx por resección quirúrgica de dos tercios del hígado, es un modelo ampliamente utilizado para el estudio de la proliferación celular (Fausto, 2000) en el que confluyen múltiples procesos de forma secuencial y coordinada. Las células remanentes proliferan para restaurar la masa del tejido extirpado, pero además, también se dan otros procesos biológicos como la inflamación, la apoptosis y la angiogénesis. Además, aunque la regeneración hepática no es exactamente una

reversión hacia el desarrollo embrionario, comparte con este proceso algunas características. El desarrollo embrionario del hígado es un proceso complejo estrechamente regulado, donde también confluyen diferentes vías de señalización que coordinan los mecanismos de proliferación, diferenciación e incluso apoptosis.

VII.1. La glándula mamaria como modelo de redes de coordinación de señales.

La glándula mamaria es un tejido complejo y altamente especializado, que sufre una extensa remodelación en cada ciclo de embarazo/lactancia. Durante el embarazo, se produce una proliferación y diferenciación del epitelio ductal y alveolar. Después del parto, las células epiteliales adquieren un fenotipo secretor que permite la síntesis de los diferentes componentes de la leche (Vorbach et al. 2006). Cuando cesa la succión, al final de la lactancia, se produce la muerte de las células epiteliales secretoras, una extensa remodelación del tejido mamario y se induce la diferenciación de los adipocitos circundantes, de modo que la glándula adquiere una estructura similar a la que presentaba antes de la gestación (Stein et al. 2004) (**Figura 8**). Estos eventos que tienen lugar durante el ciclo de embarazo/lactancia son altamente reproducibles y estrictamente controlados a nivel transcripcional (Visvader & Lindeman, 2003).

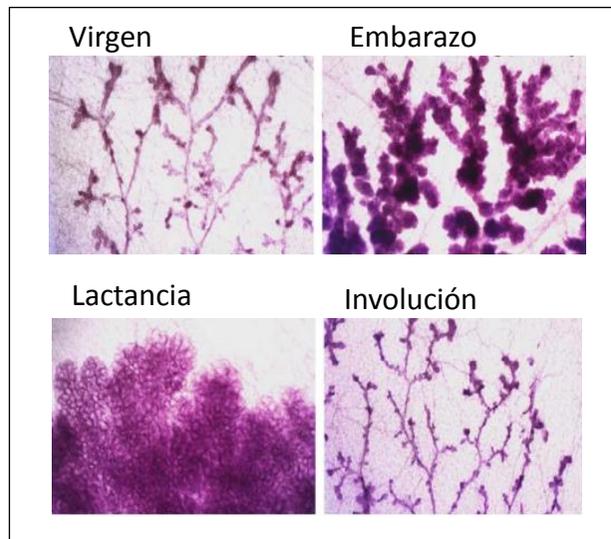


Figura 8: Estadios de desarrollo de la glándula mamaria. La glándula incrementa su volúmen durante el embarazo, llega a su máximo tamaño y actividad durante la lactancia, y regresa a un estadio inicial (previo al embarazo) tras la involución. Figura adaptada de Pepper Schedin et al. 2007.

VII.1.1. La involución de la glándula mamaria como modelo de apoptosis, inflamación y proliferación.

En la última década, la comprensión de los mecanismos moleculares y celulares del proceso de involución de la glándula mamaria murina ha aumentado considerablemente. Esto es debido principalmente a las investigaciones con ratones modificados genéticamente y a los estudios sobre perfiles transcripcionales que han proporcionado un análisis detallado de los primeros 6 días de involución (Clarkson & Watson, 2003). En la mayoría de estos

estudios se observa diferentes eventos moleculares que acontecen de forma paralela y controlada, inducidos por un destete forzado tras la retirada de las crías en el pico de lactancia, o por la acumulación de la leche mediante el sellado del pezón.

Los estudios en los que se inducía una involución mediante el destete forzado y la administración de glucocorticoides revelaron dos fases claramente diferenciadas durante la involución: la primera fase reversible tiene lugar durante las primeras 48 horas, y posteriormente hay una segunda fase de remodelación que devuelve a la glándula al estado inicial previo al embarazo (Watson, 2006a). En ambas fases se produce la confluencia de distintos procesos biológicos mediante una estrecha coordinación de señales de supervivencia/apoptosis, inflamación y proliferación celular.

- Confluencia de señales pro-apoptóticas y proliferativas durante la primera fase de involución. La primera fase de involución, se caracteriza por la aparición de células muertas que se han desprendido dentro del lumen de los alvéolos, así como por un aumento de la infiltración de neutrófilos. Se han descrito varias vías de señalización que intervienen en la primera fase de la involución. El uso de ratones modificados genéticamente ha revelado importantes cambios de expresión de varios genes que promueven o retrasan el proceso de la involución. Estos incluyen a los miembros de la familia Bcl-2: donde la supresión del gen anti-apoptótico Bcl-x acelera la apoptosis (Walton et al.

2001), mientras que la pérdida de la proteína pro-apoptótica BAX retrasa la involución (Schorr et al. 1999).

Una de las principales vías de señalización que participan en la regulación de este proceso es la vía de Jak/STAT. El factor activador de la transcripción 3 (STAT3) es crítico para el inicio de la apoptosis que caracteriza esta fase de involución. En ausencia de STAT3, la apoptosis se reprime drásticamente y la primera fase queda abolida (Chapman et al. 1999; Humphreys et al. 2002). Se ha descrito que el factor inhibidor de la leucemia (LIF) se activa en diferentes etapas del desarrollo de la glándula mamaria. Durante el embarazo, LIF tiene un papel proliferativo y de supervivencia a través de la activación de la vía de señalización de ERK. Se ha sugerido que una posible función de STAT3 en la involución es la de reprimir la vía de supervivencia de ERK1/2, potenciando de este modo los posteriores efectos pro-apoptóticos (Kritikou et al. 2003; Schere-Levy et al. 2003). Por otro lado, recientemente se ha descrito un retraso del proceso de la involución de la glándula mamaria en ratones KO de las subunidades reguladoras negativas de PI(3)K (p50 α y p55 α). Se ha observado que STAT3 induce la expresión de las subunidades p50 α y p55 α tras el destete. Esta regulación negativa conduce a la disminución en los niveles de fosforilación de AKT, una de las señales de supervivencia más importantes (Abell et al. 2005; Pensa et al. 2014) y, además, la vía de AKT activa la vía de NF- κ B mediante la degradación de I κ B α (Kane et al. 1999).

Otra vía de señalización importante durante la involución de la glándula mamaria es la vía de NF- κ B. Aunque, se ha descrito que NF- κ B favorece la proliferación celular y morfogénesis que tiene lugar durante el desarrollo postnatal de la glándula mamaria, no se conoce muy bien su papel durante la involución de este tejido tras la lactancia. De hecho, se ha sugerido que podría participar en procesos pro-apoptóticos, probablemente a través de la regulación transcripcional de ligandos de los receptores de muerte (RD): el factor de necrosis tumoral α (TNF α) y el inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral (TWEAK) (Baxter et al. 2006).

- Confluencia de señales de apoptosis, remodelación y proliferación celular durante la segunda fase de involución. La arquitectura de la glándula mamaria prácticamente no cambia durante la primera fase de la involución. Sin embargo, tras las 48 horas, cuando se produce la transición a la segunda fase, se produce un colapso de los alvéolos y un aumento de la proliferación de los adipocitos. Se han descrito varios reguladores importantes de estos procesos. Entre ellos, las MMPs degradan la matriz extracelular dando lugar a la remodelación del tejido (Green & Lund, 2005; Zaragoza et al. 2007).

Además, la degradación de la matriz induce la apoptosis de las células epiteliales. Las células que no han respondido a las señales pro-apoptóticas de la primera fase, tras la acción de las MMPs, se desprenden hacia el lumen alveolar y mueren por

apoptosis (Pullan et al. 1996). Por lo tanto las MMP tienen un doble papel como iniciadores de la apoptosis y como remodeladores de la arquitectura de la glándula mamaria. Un punto crítico importante para mantener la reversibilidad de la primera fase, es que las MMP no se activen hasta las 48 o 72 horas tras el destete. Esto se logra mediante la expresión de inhibidores tisulares de las metaloproteinasas, TIMPs (Green & Lund, 2005, Zaragoza et al. 2007).

Concomitante con la pérdida del epitelio mamario por apoptosis, se ha descrito que se requiere la proteasa MMP-3 para la diferenciación/proliferación de los adipocitos que rodean este tejido (Lund et al. 1996; Alexander et al. 2001). Sin embargo, el proceso de adipogénesis, así como su regulación durante la remodelación de la glándula mamaria, no se conoce por completo, y aún queda mucho por aprender acerca de este proceso.

- Señales pro-inflamatorias durante ambas fases de involución. Los fagocitos también son un constituyente importante del proceso de remodelación, participando en la autofagia y la fagocitosis de las células que han muerto por apoptosis (Monks et al. 2005). En la segunda fase de la involución, principalmente al 4 día tras el destete, se activan mediadores pro-inflamatorios que participan en la señalización para la atracción de macrófagos al tejido (Stein et al. 2004).

Las señales pro-inflamatorias no se producen únicamente durante la segunda fase de involución, sino que se ha

demostrado que tienen un destacado papel a lo largo de toda la involución. El proceso de inflamación está ampliamente controlado y equilibrado por los mediadores anti-inflamatorios, de modo que se previene una inflamación excesiva (Clarkson et al. 2004; Stein et al. 2004). Este equilibrio parece estar desregulado en ausencia de STAT3 o NF- κ B (Chapman et al. 1999; Baxter et al. 2006) provocando importantes anomalías en la involución de la glándula. Se ha sugerido que estas dos vías de señalización, STAT3 y NF- κ B, no sólo modulan el equilibrio muerte/supervivencia de las células epiteliales de la glándula mamaria durante la involución, sino también la respuesta inflamatoria. En este sentido, nuestro grupo ha demostrado que NF- κ B se une al promotor de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) a las pocas horas tras el destete forzado de las crías (Zaragozá et al. 2005). El posterior aumento de expresión de esta enzima y de los niveles de NO en la glándula mamaria sugieren que NF- κ B está implicado en la modulación de la expresión de iNOS. Por otro lado, la importancia de la interrelación entre las vías de NF- κ B, STAT3 y el NO en la involución de la glándula mamaria se pone de manifiesto en los estudios llevados a cabo en modelos murinos de iNOS $-/-$. La involución retrasada que se observa en ratones iNOS $-/-$ respecto a los ratones *wild type*, va acompañada de un retraso en la activación de las vías de señalización de STAT3 y NF- κ B (Zaragozá et al. 2010).

Finalmente, el NO podría ser en parte responsable de la propagación de la respuesta inflamatoria que modula fases más

tardías de la involución. Un claro ejemplo de este efecto es la nitración de la catepsina D que se observa en la glándula mamaria a las 72h tras el destete. La nitración en la tirosina 168 de la catepsina D produce un aumento de la actividad de este enzima de crucial importancia para la remodelación de la glándula (Zaragozá et al. 2009).

En los últimos años, se ha sugerido que el proceso de regresión post-lactancia proporciona un entorno inflamatorio idóneo para la progresión tumoral (McDaniel et al. 2006). Por lo tanto, es fundamental profundizar en las vías de señalización implicadas en este proceso, así como conocer los mecanismos que regulan la expresión génica durante la involución de la glándula mamaria.

VII.1.2. Descoordinación de señales en la glándula mamaria: la transformación neoplásica.

El cáncer puede ser considerado como una enfermedad en la que los procesos de señalización que regulan el crecimiento y la morfogénesis del tejido normal se desregulan para facilitar la proliferación descontrolada de las células tumorales, así como su capacidad de invasión. Dada la plasticidad funcional de la glándula mamaria, los tumores de mama están expuestos a distintos microambientes que pueden alterar la progresión y el resultado de la enfermedad. En este sentido, existen una gran cantidad de

investigaciones sobre la relación de las vías de señalización que tienen lugar durante el desarrollo de la glándula mamaria, así como el proceso pro-inflamatorio tras el destete, y el cáncer de mama.

La involución post-lactancia representa un proceso importante para la eliminación controlada de las células epiteliales innecesarias, por lo que, este proceso parece totalmente opuesto a la proliferación desregulada que ocurre en el cáncer. En consecuencia, ha habido mucho interés en la definición de cómo los procesos de señalización presentes en la involución post-lactancia se desregulan en el cáncer, donde los mecanismos de apoptosis de las células epiteliales se han suprimido. Las investigaciones utilizando modelos animales han revelado que durante la involución muchos de los mediadores de apoptosis, remodelación e inflamación, así como la modulación selectiva de estos mediadores, también participan en el desarrollo del cáncer (Watson, 2006b).

Como se ha mencionado, la involución de la glándula mamaria tras el destete es un proceso complejo en el que están implicadas diferentes vías de señalización. En este sentido, no es de extrañar que una misma proteína reguladora participe en diferentes procesos biológicos. (Reuter et al. 2010; Shaulian, 2010). De hecho, muchas de las proteínas que están implicadas en la involución de la glándula mamaria, se han identificado como oncogenes o factores de transcripción activados durante la transformación neoplásica. Un claro ejemplo de ellos son STAT3 y NF- κ B, ya que no sólo modulan la muerte celular y la proliferación, sino que también están involucrados en el desarrollo y la progresión tumoral mediante la inducción de un ambiente pro-inflamatorio, como

ocurre durante la involución de la glándula mamaria (Chariot, 2009).

Por lo que se refiere a la familia NF- κ B, p100/p52 y p50/p65 se han visto sobre-expresados o activados en líneas celulares de cáncer de mama, tumores de mama humanos primarios y otros tumores malignos (Dejardin et al. 1995; Sovak et al. 1997; Zubair & Frieri, 2013). Además, se ha demostrado que la inhibición de la señalización de NF- κ B en ratones transgénicos conlleva a una reducción de la carga tumoral (Connelly et al. 2011). Estos datos indican que, además de la función de NF- κ B como un inductor de la respuesta inflamatoria, la activación de este factor transcripcional en las células epiteliales contribuye activamente a la progresión del tumor y podría ser una diana terapéutica potencialmente eficaz.

VII.2. El hígado como modelo de redes de coordinación de señales.

Durante la segunda mitad del siglo 20, tras la explosión de la biología molecular, se ha profundizado mucho en la comprensión del control de la expresión génica en los hepatocitos, llegándose a conocer más que en cualquier otro tipo celular. De hecho, muchas de las tecnologías que se convirtieron en clave para la investigación

de la función celular en general, tales como la producción de bibliotecas de cDNA, los ensayos de desplazamiento de electromovilidad para identificar proteínas de unión a DNA, la huella de DNA (*DNA footprinting*) *in vivo* para identificar la ocupación de los factores de transcripción dentro de los promotores, se establecieron por primera vez en el hígado. Además de facilitar los rápidos avances en el estudio de la expresión génica, la capacidad del hígado para regenerarse en respuesta a un daño, también permitió la identificación de los mecanismos que regulan la proliferación de células de mamíferos, el ciclo celular, y la reparación del DNA *in vivo*. La mayoría de estos avances, ya sea en la comprensión de control de la expresión génica o la proliferación celular, describen mecanismos fundamentales que son aplicables a todos los aspectos de la biología.

La regeneración hepática y el desarrollo del hígado embrionario son dos de los modelos fisiológicos más estudiados. En ellos confluyen diferentes procesos biológicos estrechamente regulados por diferentes vías de señalización y factores de transcripción.

VII.2.1. Regeneración hepática.

Como ya se ha descrito en la involución de la glándula mamaria, en la regeneración hepática también confluyen diferentes procesos biológicos, tales como proliferación, diferenciación, inflamación, apoptosis y angiogénesis.

Desde hace siglos se conoce que el hígado tiene la capacidad de auto-regenerarse. Históricamente, la hepatectomía parcial (PHx) en roedores ha sido uno de los modelos experimentales más estudiados, revelando los mecanismos moleculares y celulares que tienen lugar durante la regeneración hepática (Michalopoulos, 2010). El uso de ratones modificados genéticamente también ha facilitado el estudio de las moléculas y vías de señalización que participan en la regeneración del hígado (Riehle et al. 2011). En los últimos años, se ha utilizado perfiles de expresión génica globales para elucidar la compleja cascada de eventos moleculares que regulan la regeneración del hígado. Aunque, muchos de estos aspectos están todavía en investigación.

Tras la PHx existe una respuesta regenerativa rápida y sincronizada en el tejido remanente, con el fin de aumentar el número de células y restablecer las funciones del hígado. La PHx desencadena una secuencia de eventos que proceden de una manera ordenada. En un modelo propuesto por Fausto (2000), se describió que hay al menos dos fases distintas durante la regeneración del hígado que son regulados a través de diferentes mecanismos:

Fase de sensibilización o *priming*

En esta primera fase, los hepatocitos quiescentes o en fase G0 pasan a fase G1 del ciclo celular y se preparan para responder de forma potente ante diferentes estímulos mitogénicos. Muchos de los genes, que participan en la fase de *priming* de la regeneración del hígado, han sido identificados usando modelos transgénicos de

ratón, y a través del uso de *arrays* de oligonucleótidos de alta densidad (Su et al. 2002). Sin embargo, la información sobre el patrón de la expresión génica, así como su regulación, en este período de *priming* y las etapas posteriores, es todavía limitada.

Durante esta primera fase de la regeneración, tras la PHx, existe un incremento sérico y hepático de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α y la interleuquina-6 (IL-6) (Trautwein et al. 1996; Iwai et al. 2001). Además hay un aumento de la actividad de diferentes factores transcripcionales, como NF- κ B o STAT3 (FitzGerald et al. 1995; Cressman et al. 1995). En esta fase de *priming*, correspondiente a las primeras 4 horas tras la HPx, se activan los genes de respuesta rápida (Su et al. 2002). De esta forma, la célula se sensibiliza para la posterior replicación, aunque esta fase puede ser fácilmente revertida y su progresión hacia la división celular dependerá de la presencia de otras señales de regulación. De hecho, si estas señales están ausentes, la célula simplemente retorna a la fase quiescente (Friedman et al. 1984).

Otro de los factores transcripcionales clave en este proceso de *priming* en la regeneración del hígado, es la proteína c-Myc, puesto que modula la expresión de proteínas importantes para la progresión del ciclo celular. Se ha demostrado que Id2 se une a un complejo represor en el promotor de c-myc que afecta a la estructura de la cromatina (**Figura 9**) (Rodríguez et al. 2006). En hepatocitos quiescentes Id2, junto con mSin3A (un co-represor que constituye el núcleo del complejo HDAC1 y HDAC2), E2F4 y p130, se unen al promotor de c-myc reprimiendo su expresión. Tras la estimulación después de la PHx, Id2 y mSin3A (HDAC) se liberan del

promotor de c-myc y posteriormente se produce un aumento transcripcional de c-myc. Por otro lado, este aumento de la expresión de c-myc, viene acompañado por un aumento de los niveles de mRNA de Id2. Dado que c-myc modula la expresión de Id2. Estas observaciones proponen que Id2 forma parte de los procesos de *priming* (Rodríguez et al. 2006).

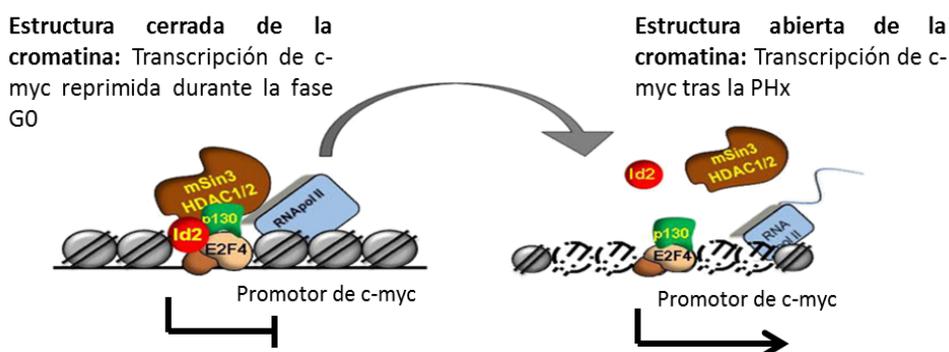


Figura 9. Modelo propuesto como mecanismo de regulación de la expresión de c-myc por Id2 en hígado tras PHx. En la fase G0, E2F4, p130, Id2 y el complejo HDAC están unidos al promotor de c-myc. Pol II se encuentra pausada en el promotor del gen. La configuración cerrada que adquiere la cromatina impide la progresión de Pol II. Tras la PHx, Id2 y el complejo HDAC se liberan. La estructura abierta de la cromatina permite a Pol II progresar. La expresión de c-myc se activa de forma transitoria. (Figura adaptada de García-Trevijano et al. 2013).

Por lo tanto, al igual que ocurre con el gen de c-myc, se ha visto que hay cientos de genes diana de E2F que, aunque su transcripción depende de las proteínas RB, no muestran el mismo perfil de expresión génica. Por eso se propone que varios genes con secuencias diana comunes podrían estar activados simultáneamente por un mecanismo común, pero sólo los factores

adicionales y específicos determinarían el patrón final de expresión génica. En este sentido, Id2 podría desempeñar un papel como parte de un mecanismo común para la regulación de la transcripción de los genes modulados por E2F.

Al igual que en la involución de la glándula mamaria, iNOS tiene un papel fundamental durante la regeneración hepática. En las primeras fases de la regeneración del hígado, hay un aumento de la producción de NO como consecuencia de la sobreexpresión y activación de iNOS (Hortelano et al. 1995). Este aumento de los niveles de NO parece ser necesario para producir un aumento de la proteína antiapoptótica Bcl-XL, que se traduce en una disminución de la muerte celular por apoptosis (Carnovale & Ronco, 2012). Además, la respuesta proliferativa de los hepatocitos tras la HPx está retrasada en ratones KO de iNOS. En lugar de ello, la HPx es seguida por un aumento de la actividad de la caspasa 3, la muerte de hepatocitos, y la insuficiencia hepática (Rai et al. 1998). De acuerdo con estos datos, se ha demostrado que el NO ejerce efectos hepatoprotectores y anti-apoptóticos en varias situaciones patológicas. Por ejemplo, la lesión hepática inducida por tetracloruro de carbono es mayor en los animales que carecen del gen iNOS (Morio et al. 2001). Además, este nivel de NO participa en el aumento de los niveles de VEGF a las 72 horas tras la hepatectomía, necesario para inducir la neovascularización (Ronco et al. 2007).

Fase de proliferación

En esta segunda fase, los hepatocitos responden a factores de crecimiento y progresan a través de la fase G1 del ciclo celular (Fausto, 2000). Este período se asocia con la inducción de genes implicados en el control del ciclo celular, incluyendo la ciclina D1, fox M1b, las quinasas dependientes de ciclinas, y el inhibidor de quinasas dependientes de ciclina p21 (también conocida como CDKN1A) (Albrecht et al. 1997; Wang et al. 2002; Abrecht & Hansen, 1999).

Dada la activación simultánea de las diversas vías que se produce después de la HPx, se producen cambios significativos en la expresión génica global durante este proceso. En la evaluación de perfiles de expresión génica durante la fase G1 temprana, G1 tardía, y la fase S del ciclo celular tras la PHx, White y colaboradores (2004) describen una disminución inicial en la expresión de genes implicados en el metabolismo de los esteroides y de los lípidos y en la biosíntesis de hormonas, es decir, de las actividades normales desempeñadas por el hígado quiescente. Como era de esperar, más adelante hay un aumento de la expresión de los genes implicados en la síntesis de proteínas y en la organización del citoesqueleto. En los primeros minutos después de la hepatectomía parcial, se produce un cambio en el perfil transcripcional. Este cambio transcripcional consiste en un aumento de los niveles de expresión de genes implicados en la regulación de la transcripción: Foxd3, foxi1, CUX1, ER y E2F-1, posteriormente se activan c-jun, Myb, Ets-1, Elk-1 y USF, que están asociados con la replicación del DNA (White et al. 2005). Estos datos demuestran que el hígado responde

inicialmente a la PHx con grandes cambios en la expresión génica, y sugieren que existen mecanismos genómicos y epigenómicos que actuarían para preparar a los hepatocitos quiescentes para la replicación del DNA, que se produce aproximadamente 12 horas tras la HPx de ratón.

VII.2.2. El Hígado en desarrollo.

Al igual que ocurre en la involución de la glándula mamaria, diferentes procesos biológicos como la organogénesis, la proliferación o la diferenciación celular, así como la apoptosis, confluyen de manera coordinada a lo largo del desarrollo hepático. Además, aunque el desarrollo embrionario del hígado no es una recapitulación exacta de la regeneración hepática, ambos procesos comparten factores clave para promover la proliferación celular (Otu et al. 2007).

Los análisis por microarrays han demostrado que el hígado fetal sufre grandes cambios a nivel transcripcional de forma secuencial durante el desarrollo (Lee et al. 2012a). En embriones de 8 días de desarrollo, antes del proceso de organogénesis, tiene lugar la especificación, donde células del endodermo se diferencian ligeramente para adquirir un destino celular específico. En este sentido, se han identificado diferentes factores de transcripción que controlan las etapas iniciales del desarrollo hepático (Cirillo et al. 1998; Cirillo et al. 2002; Cirillo & Zaret, 1999). Posteriormente, cuando las células del endodermo ya se han especificado, en

embriones de ratón de 9 días de desarrollo, empieza el proceso de organogénesis propiamente dicho. En este punto del desarrollo se coordinan diferentes procesos de proliferación, migración, adhesión y diferenciación para formar el divertículo hepático. Este, recubierto por células del endodermo o hepatoblastos, se reorganiza para generar un epitelio pseudoestratificado. Esta transición se caracteriza por la migración del núcleo a la parte apical de la célula durante la mitosis.

Señales de proliferación/diferenciación

Tras la invasión del tabique transversal por parte de los hepatoblastos, estos continúan proliferando y, por lo tanto, se produce una expansión del tejido hepático. En este punto del desarrollo hepático se han descrito numerosas vías de señalización que promueven dicha proliferación. Se ha observado que una disminución de los niveles de expresión de los genes involucrados en esta vía produce una disminución de la tasa de proliferación de los hepatoblastos (Hilberg et al. 1993; Nishina et al. 1999).

La vía de señalización del TGF- β , a través de las proteínas efectoras Smad2/Smad3, también estimula la proliferación. Ratones con mutaciones en los genes Smad2 y Smad3 presentan una hipoplasia del hígado (Weinstein et al. 2001). Además, confluyen otras vías de señalización como la de Wnt y factores de transcripción que regulan la proliferación de los hepatoblastos. Estos incluyen Prox-1 (Kamiya et al. 2008) y FoxM1B, que activan la expresión de reguladores de la fase G2/M del ciclo celular

(Krupczak-Hollis et al. 2004). El inhibidor de la diferenciación 3 (Id3), se expresa transitoriamente durante las primeras etapas del desarrollo de hígado de pollo, y se ha descrito que una depleción de Id3 inhibe la proliferación de los hepatoblastos (Nakayama et al. 2006). Por último, el factor de transcripción N-Myc y el factor de transcripción homeobox (HLX) están, a diferencia de los factores de transcripción previamente descritos, expresados en las células mesenquimales (Hentsch et al. 1996; Giroux & Charron, 1998).

Tras la etapa de adquisición de un linaje determinado, las células que van a diferenciarse en hepatocitos sufren un proceso de maduración que consiste en la adquisición progresiva de la morfología y funciones fisiológicas. Hay numerosos factores de transcripción que controlan esta etapa de maduración de los hepatocitos, entre ellos cabe destacar: HNF-1 α , HNF-1 β , FoxA2, HNF-4 α 1, HNF-6, y LRH-1 (Kyrnizi et al. 2006; Beaudry et al. 2006).

La regulación transcripcional en esta fase de maduración de los hepatocitos, no se conoce del todo bien. El papel funcional de los diferentes factores transcripcionales parece ser paradójico y depende del contexto en el que actúen. En este sentido, se ha descrito que la oncostatina M (OSM), una citoquina de la familia IL-6, produce una disminución de la expresión de la ciclina D1 y D2 en cultivo primario de hepatocitos fetales, induciendo la diferenciación hepática. La expresión ectópica de receptores defectuosos en la activación de STAT3 indicó que la disminución de la expresión de ciclinas D1 y D2 por OSM estaba mediada por STAT3. Además, la forma constitutivamente activada de STAT3 suprime la expresión de la ciclina D1 en hepatocitos fetales, al contrario de lo que ocurre

en regeneración hepática o en líneas de hepatoma donde se observa un aumento transcripcional de ciclina D1 (Yaginuma & Koike, 1989; Cressman et al. 1996). Todo ello, indica que la disminución de la expresión de ciclina D1 mediada por STAT3 es bastante específica de los hepatocitos fetales que están en esta última fase de maduración, donde se produce una reducción de su potencial de proliferación (Matsui et al. 2002).

Para finalizar, aunque se conoce bien el papel de Id3 durante las primeras etapas del desarrollo embrionario del hígado (Nakayama et al. 2006) y, aunque se ha descrito el importante papel de Id2 en el desarrollo de otros órganos (Mori et al. 2000; Yokota, 2001) se desconoce su posible papel en este modelo de desarrollo hepático.

Señales de apoptosis/supervivencia

Por otro lado, se ha descrito que tanto la proliferación celular, como el proceso de apoptosis, tienen lugar durante el desarrollo normal de la placa ductal. En este sentido, mientras algunas células biliares precursoras están en proliferación, otras entran en apoptosis, y se piensa que el resultado de una correcta coordinación entre estos procesos da lugar a un desarrollo normal de los conductos biliares intrahepáticos (Bai & Odin, 2003). La alteración de la regulación de la apoptosis en el desarrollo fetal puede conducir a malformaciones de la placa ductal. Terada y Nakanuma (1995) observaron mayores niveles de Bcl-2 en las etapas posteriores del desarrollo de la placa ductal, donde el

número de células apoptóticas disminuye, en comparación con las primeras etapas (Terada & Nakanuma, 1995). Además, Sergi y colaboradores (2000) también demostraron la importancia de la apoptosis durante el desarrollo hepático, mostrando que en los fetos con síndrome de Meckel, un síndrome recesivo autosómico en el que la placa ductal presenta malformaciones, aumentan los niveles de Bcl-2 y disminuyen el número de células apoptóticas en comparación con fetos control de la misma edad (Sergi et al. 2000).

Además de las señales pro-apoptóticas, también hay un aumento de la expresión de moléculas que participan en la supervivencia celular. En este sentido, se ha observado que el TNF- α induce apoptosis en las células hepáticas al mismo tiempo que estimula una cascada de señalización que activa NF- κ B, que realizaría una función pro-supervivencia en este tejido. De hecho, ratones KO de la IKK o de NF- κ B (p65), mostraron un aumento de los niveles de apoptosis en el hígado. Curiosamente, este aumento de la apoptosis se contrarrestaba por la inactivación del receptor de TNF- α , lo que indica que NF- κ B protege contra la apoptosis inducida por TNF en hepatoblastos (Doi et al. 1999). Por otro lado, otra vía de supervivencia muy importante en este tejido es la desencadenada por c-Raf-1. Se ha observado que este protege a los hepatoblastos de la apoptosis inducida por la unión de FasL a su receptor (Piazzolla et al. 2005).

En resumen, los análisis con embriones de ratón con mutaciones en varios genes que codifican para diferentes factores de transcripción o proteínas reguladoras, sugieren que existe una

red de proteínas que participan de forma secuencial en la regulación de la expresión génica durante el desarrollo y la morfogénesis del hígado, y que estos procesos están estrechamente entrelazados. Por último, aunque se conoce mucho sobre este proceso, aún queda mucho por indagar acerca de los mecanismos moleculares que controlan el desarrollo del hígado como órgano.

VII.2.3. El hígado en la transformación neoplásica.

La hepatocarcinogénesis es un proceso complejo que resulta de una combinación de alteraciones epigenéticas y genéticas. En las últimas décadas, se ha hecho un gran esfuerzo por identificar moléculas clave que participan en el desarrollo y la progresión del carcinoma hepatocelular o hepatocarcinoma (HCC). La patogénesis del HCC se asocia frecuentemente con una muerte inicial de los hepatocitos, infiltración de células inflamatorias y una regeneración/proliferación compensatoria del hígado. Las etiologías más importantes relacionados con el desarrollo de HCC incluyen la infección viral por hepatitis B (VHB) y C (VHC), y el consumo excesivo de alcohol, esteatosis, inflamación y cirrosis (Farazi & DePinho, 2006). Por lo tanto, la comprensión de las vías de señalización moleculares que median estos procesos durante la tumorigénesis del hígado es importante para la identificación de nuevas dianas terapéuticas.

Se han descrito numerosas rutas de señalización desreguladas en HCC, entre ellas se incluyen la vía Wnt/ β -catenina, donde se ha observado una inactivación del gen APC o una mutación del proto-oncogén β -Catenina, impidiendo de ese modo su degradación (Herbst & Kolligs, 2007; Huang et al. 1999; Colnot et al. 2004). Otras vías como la de las MAPK, PI3K/AKT, TGF- β , entre otras, están involucradas en la desregulación del crecimiento celular y tienen un papel fundamental en la determinación de la progresión del hepatocarcinoma y su agresividad (Sato & Kaziro, 1992; Hu et al. 2003; Kawate et al. 1999). Como hemos visto anteriormente, la vía de señalización de NF- κ B promueve la supervivencia de los hepatocitos en el hígado en desarrollo. Además, también juega un papel crucial en las respuestas inflamatorias del hígado mediante el control de la expresión de varios factores de crecimiento y citoquinas. Una de estas citoquinas es IL-6, esta ejerce muchas de sus funciones a través de la activación de STAT3, un importante factor transcripcional en el desarrollo del HCC (Maeda et al. 2005; He et al. 2010).

NF- κ B aparentemente desempeña funciones opuestas en diferentes modelos de HCC de ratón. Mientras en algunos modelos desempeña un papel pro-oncogénico, en otros impide el avance tumoral. En este sentido la supresión específica del gen IKK β en hepatocitos, y por lo tanto la inactivación de NF- κ B, conduce a una mayor incidencia de tumores en el hígado tras el tratamiento con el carcinógeno dietilnitrosamina (DEN) (Maeda et al. 2005). Del mismo modo, la ablación de la subunidad reguladora IKK γ /NEMO del complejo IKK en hepatocitos, produce una disminución de la

actividad de NF- κ B, desarrollando una hepatitis crónica y HCC (Luedde et al. 2007). Sin embargo, un artículo anterior demostró que la inhibición de la actividad de NF- κ B en las células del parénquima hepático en fases posteriores del desarrollo del cáncer producía una reducción del tumor (Pikarsky et al. 2004). Esto podría ser explicado porque varios genes diana de NF- κ B tienen actividad citoprotectora, por lo que la inactivación de NF- κ B podría sensibilizar a los hepatocitos a la apoptosis, y la pérdida de la masa de células de parénquima desencadenaría una respuesta regenerativa potente. Esta proliferación compensatoria de los hepatocitos en condiciones inflamatorias aumenta el riesgo de transformación neoplásica. Sin embargo, la disminución de la progresión tumoral observado por la inhibición de la actividad de NF- κ B en las etapas posteriores puede reflejar el papel clave desempeñado por este factor de transcripción en la supervivencia de las células ya transformadas. Por lo tanto, la preservación de la supervivencia de los hepatocitos puede reducir indirectamente la tumorigénesis mediante la atenuación de la respuesta proliferativa compensatoria, ya que los hepatocitos con mutaciones oncogénicas no entrarían en el ciclo celular (Sakurai et al. 2006).

Para finalizar, todavía se desconoce la implicación exacta de las Id en el carcinoma hepatocelular (HCC). A diferencia de la expresión continua de las proteínas Id durante el cáncer de mama, de próstata y de la carcinogénesis de colon, se han observado diferencias en los niveles de expresión de Id1, Id2 e Id3 en las diferentes etapas del HCC. Se ha sugerido que las proteínas Id podrían desempeñar un papel en las primeras etapas de la

hepatocarcinogénesis, pero no en el desarrollo del carcinoma avanzado (Damdinsuren et al. 2005). Por lo tanto, es fundamental profundizar en el papel que ejercen las diferentes proteínas Id en el hígado para poder entender mejor su implicación en este proceso neoplásico.

OBJETIVOS

I. Objetivos

El objetivo general del presente trabajo de tesis consiste en analizar el papel de NF- κ B e Id2 como nodos de regulación transcripcional en un contexto fisiológico en el que tienen lugar varios procesos biológicos, moleculares y celulares de forma simultánea y coordinada.

Con el fin de comprender mejor los complejos mecanismos por los que NF- κ B regula la transcripción de los genes diana, se estudiara el papel de este factor transcripcional como un nodo de la regulación durante la involución de la glándula mamaria. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar, mediante experimentos ChIP/chip, los genes diana para el factor NF- κ B transcripcionalmente activos durante la involución de la glándula mamaria.

- 1.1. Determinación y análisis del sitio de unión de NF- κ B a los promotores, junto con su coactivador p300.
- 1.2. Validación de los resultados obtenidos en el ChIP/chip.
- 1.3. Análisis bioinformático de las funciones moleculares y biológicas de aquellos genes que presenten unido el complejo formado por NF- κ B y p300.

2. Estudiar el papel de los genes diana de NF- κ B y p300 durante la involución de la glándula mamaria.

- 2.1. Estudio de la función de los genes seleccionados durante la muerte celular programada que tiene lugar tras el destete.

Anteriormente hemos observado a nivel fisiológico que Id2, junto con E2F4, forma parte de un complejo represor en el promotor de c-myc, afectando a la estructura de la cromatina (Rodríguez et al. 2006). Por lo tanto, con el fin de determinar si la proteína Id2 tiene un papel general sobre la regulación de la expresión de genes modulados por E2F4 en hígado adulto quiescente, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la unión de Id2 a un grupo concreto de genes modulados por E2F4, mediante experimentos de CHIP/chip en hígado de ratón adulto.

- 1.1. Determinación y análisis del sitio de unión de Id2 a los promotores.
- 1.2. Análisis bioinformático de las funciones moleculares y biológicas de aquellos genes unidos por E2F4/Id2.

2. Papel de Id2 en el proceso biológico que se haya seleccionado a partir de los resultados derivados del apartado 1.3.

2.1. Validación de los resultados obtenidos en el ChIP/chip, en modelos experimentales *in vivo*. Unión de Id2 a una selección de genes y correlación con la expresión de dichos genes.

2.2. Dado que los niveles de expresión de Id2 son claves para la función de esta proteína, se estudiará la regulación de la expresión de Id2 en este modelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Animales de experimentación.

Los ratones C57BL/6 (taconic) utilizados en todos los estudios se mantuvieron en jaulas individuales en un ambiente controlado, a una temperatura ambiental de 20-22°C y ciclos de 12 horas luz/oscuridad. En todos los casos los animales tuvieron acceso a alimentos y agua *ad libitum*.

En todos los estudios se siguieron estrictamente las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos según se establece en la ley 2010/63/UE y el Real Decreto 53/2013. Los protocolos experimentales fueron, además, aprobados por la Comisión de Investigación Experimental Ética de la Universidad de Valencia.

Según el propósito del estudio, los modelos animales se clasifican en dos grupos:

A) Los estudios de NF-κB como nodo de regulación de redes transcripcionales se llevaron a cabo en la glándula mamaria murina durante la fase de involución tras el destete forzado de las crías. En todos los casos se utilizaron al menos cinco animales para cada condición:

- **Grupo control en fase de lactancia:** Ratones hembra que tienen entre siete y diez crías y se encuentran en el pico de la lactancia (9-11 días después del parto).

- **Grupo en fase de involución tras el destete forzado:** Formado por ratones de las mismas características que las del grupo control, alimentados y mantenidos en idénticas condiciones. Sin embargo a este grupo, se les retirarán las crías a las 6, 24, 48, y 72 horas antes de la realización de los experimentos.

B) Los estudios de Id2 como nodo de regulación de redes transcripcionales se llevaron a cabo en hígado de ratones macho de 13 semanas. En todos los casos los grupos experimentales estaban formados por al menos 5 animales, estableciéndose los grupos que se indican a continuación:

- **Grupo control:** Se utilizaron hígados de ratones adultos (hígado quiescente) como control para los estudios de desarrollo.
- **Grupo de desarrollo fetal:** Se sacrificaron ratones a los 14 días de gestación (el día que se observa la aparición del tapón vaginal se considera el día 0). Los hígados de todos los fetos procedentes de la misma hembra se unificaron y fueron considerados como una única muestra.
- **Grupo de regeneración hepática:** Se realizaron hepatectomías parciales de 2/3 del hígado en ratones adultos para estudios de regeneración hepática. Los

hígados fueron recogidos 3 horas después de la operación, para su posterior estudio.

- **Grupo “SHAM” u operación simulada:** Se realizó un procedimiento quirúrgico de hepatectomía simulada en el que se somete al ratón a una laparotomía en la cavidad peritoneal sin la consiguiente hepatectomía y su posterior sutura.

II. Cultivos celulares.

Se utilizaron células epiteliales de mama de ratón NMuMG, obtenidas de la ATCC (Manassas, VA, EE.UU.). Estas células se cultivaron de forma rutinaria en medio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) suplementado con suero bovino fetal al 10%, 10 µg/ml de insulina, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Las condiciones de cultivo en todos los casos fueron las mismas. Las células se mantuvieron en incubadores con una temperatura constante de 37°C y un porcentaje de CO₂ del 5 %.

III. Extracción de tejido.

Para la obtención de tejido, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (Abbott Laboratories, S.A) por inyección intraperitoneal (60 mg/Kg de peso corporal, en NaCl 0.9%). El hígado o la glándula mamaria inguinal se extrajeron rápidamente,

se lavaron con suero fisiológico y se secaron sobre papel de filtro. Posteriormente el órgano fue pesado e inmediatamente congelado por la técnica del *freeze-clamped* con dos bloques de aluminio previamente enfriados por inmersión en nitrógeno líquido (Wolleberger et al. 1960). Finalmente, las muestras se almacenaron a -80°C hasta su procesado. En el caso en el que las muestras se utilizaran posteriormente en estudios histológicos, fraccionamientos subcelulares, experimentos de inmunoprecipitación de cromatina o en actividades enzimáticas, los órganos se pre-procesaron de forma distinta según el experimento (Ver en posteriores apartados).

IV. Extracción y cuantificación de proteínas.

La extracción de proteínas totales se realizó a partir de 0.2 - 0.3 g de tejido congelado. El tejido correspondiente fue homogenizado utilizando el homogenizador Ultra-Turrax[®] basis (IKA[®]-Werke GmbH & Co.), con tampón RIPA (1.8 mM NaH_2PO_4 , 8.4 mM Na_2HPO_4 , SDS 0.1 % (p/v), Tritón-X100 1.0 % (v/v), 0.1 M NaCl, Deoxicolato sódico 0.5% (p/v)). A excepción de aquellos experimentos de medida de actividad de calpaína endógena o con calpaína recombinante, el tampón RIPA fue suplementado con 1mM PMSF, 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de inhibidores de proteasas y 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de inhibidores de fosfatasa (Calbiochem) a 4°C . Tras la homogenización, las muestras se incubaron a 4°C durante 30 minutos, agitando en vórtex cada 10 min. Posteriormente, se

centrifugaron a máxima velocidad (14000g) durante 30 min a 4°C. El sobrenadante de dicha centrifugación, que contiene el extracto proteico, se recogió y se congeló a -80°C hasta el momento de su uso.

Las muestras de proteínas, se cuantificaron mediante el reactivo comercial BCA (Bicinchoninic acid; Pierce Chemical Co), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el análisis de los extractos nucleares y citosólicos, las proteínas se cuantificaron utilizando el método de Bradford (Bio-Rad).

V. Aislamiento y cuantificación de RNA.

El RNA total de los diferentes tejidos se extrajo usando el reactivo comercial TRIzol (Invitrogen Life Technologies), seguido de una purificación adicional en columna (RNeasy; Qiagen). La concentración y la pureza del RNA se evaluaron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 (NanoDrop Technologies). Por otro lado, la integridad del RNA se comprobó mediante electroforesis en un gel MOPS, observándose un doblete de bandas correspondiente al RNA ribosómico 28S y 18S.

VI. Fraccionamiento subcelular.

Para el fraccionamiento subcelular se utilizaron diferentes muestras de tejido fresco de hígado, ya sea procedente de ratones adultos o fetales. Las fracciones nucleares y citosólicas se

extrajeron con el kit comercial "*Nuclear extract kit*" siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (Active Motif, Carlsbad). Brevemente, los diferentes tejidos fueron troceados en pequeños fragmentos de 2-3 mm² y homogenizados en un homogenizador de vidrio tipo *Dounce* con tampón hipotónico. Posteriormente, tras una centrifugación a 850g de 10 min, se recogieron las células intactas. A continuación, estas células fueron lisadas mediante una incubación de 15 min en hielo con tampón hipotónico suplementado con detergentes. Después de esta incubación, los núcleos se recogieron por centrifugación (10 min, 14000g a 4°C) y el sobrenadante se recuperó como fracción citosólica. El precipitado, formado fundamentalmente por núcleos intactos, se lisó mediante una incubación de 30 min con un tampón de solubilización nuclear y con agitación suave. Finalmente, se separó el sobrenadante mediante una centrifugación de 10 min a 14000g y a 4°C. Este sobrenadante, con el extracto enriquecido en proteínas nucleares, se congeló a -80°C hasta el momento de su uso.

VII. Análisis de expresión génica por qPCR.

La retrotranscripción (RT) se llevó a cabo a partir de 0,5µg de RNA total con el *High-capacity RNA-to-cDNA kit* (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las condiciones de PCR para la obtención del cDNA fueron de una incubación inicial de 37°C durante 60 min seguidos de 5 minutos a

95°C en un termociclador Gene Amp PCR system 2700 (Applied Biosystems).

La amplificación mediante qPCR del cDNA, se realizó empleando el kit *GeneAmp Fast PCR Master Mix* (Applied Biosystems) que contiene todos los componentes necesarios para llevar a cabo la reacción de la Taq polimerasa. Las reacciones para la qPCR se llevaron a cabo con 1µL de cDNA en un volumen final de 10µL, usando el sistema 7900HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación fueron las preestablecidas por Applied Biosystem. Los *primers* específicos (*primers* pre-diseñados por Taqman) que se emplearon en el presente trabajo fueron: Capn1 (Mm00482964_m1), Capn2 (Mm00486669_m1), Capns1 (Mm00501568_m1), Atp2b2 (Mm00437640_m1), Id2 (Mm00711781_m1), c-myc (Mm00487803_m1), ep400 (Mm00551485_m1), lsm1l (Mm00659493_m1), Jmjd6 (Mm00466679_m1) y Suv39h2 (Mm00469689_m1).

Para determinar los niveles de expresión génica de los diferentes genes a analizar, se utilizó el método comparativo de Ct, conocido como método $2^{-\Delta(\Delta CT)}$ (Livak & Schmittgen, 2001). La expresión de los diferentes genes se normalizó relativizando los valores de expresión obtenidos por triplicado con respecto a un gen de expresión constitutiva (control endógeno), que en nuestro caso fue el 18S.

VIII. Quantificación de calcio intracelular.

Para la cuantificación del contenido de calcio intracelular a lo largo de la involución de la glándula mamaria se utilizó un kit de ensayo colorimétrico (Biovisión, CA, EE.UU.). Brevemente, el tejido mamario fue troceado, lavado con PBS y lisado con un homogeneizador *Dounce*. Posteriormente, por cada muestra a analizar, se utilizaron 25 μL de lisado junto con 90 μL del reactivo cromogénico (o-cresolftaleína) y 60 μL del tampón proporcionado por el kit (*calcium assay buffer*) en una placa de 96 pocillos. A continuación, la placa se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. En la misma placa se realizó una curva estándar utilizando diluciones seriadas de CaCO_3 (0-1,5 mg/dl). Finalmente se midió la absorbancia a 575 nm utilizando un lector de placas (Multiskan EX, Thermo).

IX. Medida de actividad calpaína.

La actividad Capn se midió mediante un kit comercial, *Calpain activity assay kit* (QIA-120, Calbiochem, Billerica, MA, EEUU). En este kit se mide la capacidad de las calpaínas de romper Suc-LLVY-AMC, un substrato fluorogénico sintético específico de estas enzimas, según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se incubaron alícuotas de 50 μg de extractos de proteínas de cada condición con una solución activadora (con Ca^{2+} y un agente reductor, TCEP) o con BAPTA (un quelante de calcio que bloquea

completamente la actividad calpaína). Posteriormente se midió la fluorescencia con un lector de microplacas a una longitud de onda de excitación de 360 nm y de emisión de 460 nm. De este modo, la actividad calpaína se determinó restando la actividad obtenida utilizando el tampón de inhibición a la actividad detectada con el tampón de activación.

X. Técnicas inmunológicas.

X.1. Anticuerpos.

Los anticuerpos que se han utilizado a lo largo de esta tesis se detallan en la **tabla I** adjunta. En ella se indica la dilución empleada, la casa comercial, así como la referencia y la técnica en la que se ha empleado el anticuerpo.

X.2. Western blotting.

Los extractos de proteínas, en cantidades idénticas para cada muestra (entre 10 y 25 µg) se diluyeron con tampón de carga (SDS-Laemmli Buffer: 50% glicerol v/v, 10% SDS, 25% β-mercaptoetanol y 0.05% azul de bromofenol en tampón 0.3 M Tris-HCl pH 6.8) y se desnaturalizaron por incubación a 95°C durante 5 min. Las muestras se cargaron en geles de acrilamida SDS-PAGE a diferentes porcentajes, según el peso molecular de la proteína a analizar. Las proteínas se separaron por electroforesis según el método descrito por Laemmli (Laemmli et al. 1970), en cubetas con tampón de electroforesis (0.25 M pH 8.6 Tris-HCl; 1.92 M glicina, 1 % SDS (p/v))

a voltaje constante de 100 V a lo largo del gel de concentración y de 120 V a lo largo del gel de resolución. Posteriormente, las proteínas separadas por SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Protran®, Whatman) siguiendo la técnica de Burnette (Burnette, 1981). Las condiciones de transferencia fueron de 60V durante 90 minutos en tampón de transferencia (0.25 M pH 8.6 Tris- HCl, 1.92 M glicina y 20% metanol (v/v)). Como control de la transferencia se tiñeron la totalidad de las proteínas de manera inespecífica con rojo *ponceau*.

Con el fin de evitar la unión inespecífica de anticuerpos a la membrana, evitando de ese modo un elevado fondo o falsos positivos, las membranas de nitrocelulosa se bloquearon con una solución de BSA al 5% (p/v) disuelto en TTBS (0.05 M Tris, 0.15 M NaCl y 0.05% de Tween 20) durante 1 hora en agitación y a temperatura ambiente. Las membranas, una vez bloqueadas, se incubaron durante 18-20 horas a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes, diluidos en una solución de BSA al 1% en TTBS. Posteriormente, tras 3 -5 lavados con la solución de BSA/TTBS, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (DAKO) a una dilución 1/5000 durante 1 hora. Finalmente, tras 3 o 4 lavados con TTBS, las membranas se incubaron 1 minuto con un reactivo quimioluminiscente (ECL Detection Kit, GE Healthcare). La señal luminosa resultante queda impresionada sobre una película de autorradiografía (Amersham Hyperfilm MP), la cual se revela con la máquina Curix60 (AGFA). La intensidad de las bandas se midió por densitometría usando el software de análisis de imagen Image J.

Tabla I

Anticuerpo	Aplicación	Referencia	Dilución
p65 (NF-κB)	ChIP	Santa Cruz (sc-372)	1/100
P300	ChIP	Cell Signaling (1387)	1/25
RNApol II	ChIP	Santa Cruz (sc-899)	2 µg
RNApol II	WB	Santa Cruz (sc-899)	1/1000
Capn1 -COOH	WB	Abcam (ab39170)	1/4000
Capn2-COOH	WB	Biovision (3372)	1/1000
Capn2-COOH	IF	Cell signaling (2539)	1/50
Capn1 -NH2	WB	Abcam (ab28257)	1/1000
Capn1 -NH2	IF	Abcam (ab28257)	1/100
Capn2-NH2	WB	Abcam (ab39165)	1/1000
GADPH	WB	Abcam (ab8245)	1/5000
Histone H3 –COOH	WB	Millipore (07-690)	1/40000
Histone H3 –COOH	ChIP	Millipore (07-690)	2 µg
β - Actina	WB	Abcam (ab8227)	1/2500
36/E-Caderina	WB	BD Biosciences (610182)	1/3500
36/E-Caderina	IF	BD Biosciences (610182)	1/100
β - Catenina	WB	Abcam (ab6301)	1/1000
Catenina p120	WB	Abcam (ab11508)	1/10000
Talina 1	WB	SIGMA (T3287)	1/400
Id2	WB	Santa Cruz (sc-489)	1/500
Id2	ChIP	Santa Cruz (sc-489)	2 µg
Id2	IP	Santa Cruz (sc-489)	2 µg
E2F4	ChIP	Santa Cruz (sc-866)	2 µg
USP1	WB	Cell signaling (8033)	1/1000
USP1	IP	Cell signaling (8033)	1/50

Tabla I. Listado de anticuerpos utilizados a lo largo de este proyecto de tesis. En la tabla se especifica la proteína que reconocen los distintos anticuerpos, la referencia comercial, la dilución o cantidad en µg empleada, así como la técnica en la que han sido utilizados. WB: Western blot. IP: Inmunoprecipitación. IF: Inmunofluorescencia. ChIP: Inmunoprecipitación de cromatina.

X.3. Inmunofluorescencia.

Los tejidos de glándula mamaria en el pico de la lactancia (control) y a diferentes tiempos tras el destete (6, 24, 48 y 72 horas) se fijaron con formaldehído al 4%, y posteriormente se incluyeron en bloques de parafina. A continuación se realizaron cortes de 5µm de grosor, y se montaron en un portaobjetos.

Para la inmunofluorescencia, los cortes fueron desparafinados sumergiéndolos con xileno, rehidratados con diferentes soluciones de alcohol a concentraciones decrecientes (100, 90, 70, 50 y 30% EtOH) y lavados con PBS (Sigma). La exposición de los antígenos, se llevó a cabo hirviendo las muestras a altas presiones durante 10 min con una solución de citrato sódico 10 mM pH 6. Posteriormente, se bloquearon las secciones con suero de cabra (normal goat serum 5%; Dako) en una cámara húmeda durante 1h a temperatura ambiente (TA). Después del bloqueo, las muestras se dejaron incubando durante toda la noche con los anticuerpos primarios correspondientes diluidos en PBS y 0.3% Triton-X100 (Anticuerpos IF **tabla I**). Al día siguiente, los cortes se incubaron con sus respectivos anticuerpos secundarios a TA y en oscuridad durante 1 hora. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG (Invitrogen) y Cy3 anti-mouse IgG (Sigma Aldrich) diluidos 1:400 en PBS con 0.3% Triton X-100. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342 (Invitrogen) diluido 1:1000 en agua destilada durante 10 minutos. Las imágenes fueron visualizadas y adquiridas mediante el servicio de microscopía confocal (Leica TCS-SP 2) ubicado en la Unidad Central de

Investigación de la Facultat de Medicina (UCIM) de la Universidad de Valencia. Los controles negativos se realizaron siguiendo el protocolo descrito, pero incubando los cortes tan solo con el anticuerpo secundario.

X.4. Inmunoprecipitación.

La inmunoprecipitación se realizó a partir de alícuotas de 200 µg de proteínas de tejido hepático. La reacción de inmunoprecipitación se realizó durante toda la noche en rotación y a 4°C con anticuerpos que reconocen Id2 o USP1 (**Tabla I**). Como anticuerpo no relacionado se utilizó IgG de suero normal. Al día siguiente, los complejos de proteína-anticuerpo (inmunocomplejos) se retuvieron añadiendo 50 µl de esferas de proteína A/G-sepharosa (50:50 (v/v)). Posteriormente, tras descartar los sobrenadantes, se realizaron varios lavados con PBS y Tris-HCl 0.05 M pH 8, para retirar las impurezas y las uniones no específicas. Finalmente, se recuperaron los inmunocomplejos, hirviendo las muestras a 95°C con tampón de carga de electroforesis. Los inmunocomplejos se analizaron por *Western blot* como se ha descrito previamente. Como *Input* se utilizó una fracción de los extractos de proteínas empleados para la inmunoprecipitación.

X.5. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP assay).

Los diferentes tejidos se trataron con formaldehído (1%) diluido en PBS durante 10 min, para entrecruzar el DNA con las proteínas que estuvieran unidas a él. Pasado este tiempo, la reacción se detuvo añadiendo glicina a una concentración final de 0.125 M. Posteriormente, la cromatina se extrajo siguiendo el protocolo descrito previamente (Sandoval et al. 2004).

A continuación, las muestras se sonicaron con un sonicador Vibra-Cell VCX500 (14 pulsos de 10 segundos de sonicación al 38% de amplitud y 50 segundos de descanso) obteniéndose fragmentos de cromatina en torno a un tamaño medio de ~500pb. La concentración de la cromatina en muestras diluídas 1:200 (v/v) en SDS 1% se determinó por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm. El tamaño de los fragmentos obtenidos se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa. Para ello, una alícuota de la cromatina sonicada y cuantificada, se incubo 30 min a TA con 1 µg de RNasa seguido de una incubación con 2 µl de proteinasa k durante toda la noche. Al día siguiente se purificó mediante el kit comercial PCR purification kit QIAquick® DNA (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez comprobada la efectividad del sonicado y el tamaño correcto de los fragmentos, las muestras se sometieron a un pre-clarado con esferas de proteína A/G-sefarosa previamente bloqueadas con λDNA (50 µg/ml), tRNA (500 µg/ml), y BSA (10 mg/ml). Las alícuotas de 4.5 U de cromatina en tampón de dilución (165 mM NaCl, 0.01 % SDS, 1.1 % Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM

Tris-HCl, pH 8.0) se incubaron con las esferas de proteína A/G-sefarosa (GE Healthcare). Este prelavado se realizó durante 1 hora a 4°C en rotación.

Tras el pre-aclarado, las muestras de cromatina se incubaron con 2 µg del correspondiente anticuerpo (**Tabla I**) a 4°C en rotación durante toda la noche. Otra alícuota de este sobrenadante, se trató del mismo modo, pero añadiendo un anticuerpo no relacionado (normal serum IgG, DAKO). Además, se guardó como input una alícuota del extracto total de cromatina.

Al día siguiente, las diferentes muestras se incubaron durante 4 horas a 4°C en rotación con las esferas previamente bloqueadas. Posteriormente los inmunocomplejos se lavaron con diferentes tampones: dos lavados con el tampón de baja salinidad (150 mM NaCl, 0.5% Deoxicolato Sódico, 0.1 % SDS, 1% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl), dos con el de alta salinidad (500 mM NaCl, 0.5% Deoxicolato Sódico, 0.1 % SDS, 1% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl), dos con el tampón LiCl (250mM LiCl, 0.5% Deoxicolato Sódico, 0.1% SDS, 1% Nonidet P-40, 1 mM EDTA y 50mM Tris-HCl) y finalmente se hicieron dos lavados con el tampón TE (0.25 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl).

La recuperación de los inmunocomplejos se realizó añadiendo 100 µl de buffer de elución (1% SDS, 100 mM NaHCO₃) y con una agitación fuerte durante 10 minutos. Después se centrifugaron las muestras y se recogieron los sobrenadante. Tras la elución, los inmunoprecipitados y los *inputs* se desentrecruzaron mediante incubación a 65°C durante toda la noche. Al día siguiente se añadieron 50 µg de proteinasa k y se incubaron 1 hora a 37°C.

Finalmente, el DNA de los *input* y de los inmunoprecipitados se purificó con un kit de purificación de PCR (Qiagen, Hilden, Alemania) y se analizó por qPCR con cebadores específicos y *SYBER Green*. Además, los productos de la amplificación se separaron según su peso molecular mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% y se tiñeron con bromuro de etidio. Se calculó el incremento relativo como porcentaje respecto al *input*. Las secuencias de los *primers* se muestran en la **tabla II**.

XI. Ensayo de protección frente a nucleasa de micrococo.

Para los ensayos de protección frente a nucleasa de micrococo (MNasa), se obtuvieron núcleos de hígado entrecruzado con formaldehído de forma similar a lo descrito anteriormente. Para la digestión con la MNasa las fracciones nucleares se resuspendieron en tampón RSB (10 mM de NaCl, 3 mM de MgCl₂, 1 mM de CaCl₂, 10 mM β-mercaptoetanol, 0,15 mM de espermina, 0,5 mM de espermidina, 2 μl/ml de cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma), 50 mM de Tris-HCl y a pH 7,5). Los núcleos (7×10^8) se centrifugaron a 2000g durante 3 min a 4°C y se lavaron con 1 ml de buffer RSB frío. Después de recoger los núcleos por centrifugación, los sedimentos se resuspendieron en 0,5 ml de tampón RSB sin inhibidores, y se incubaron con 150 unidades de nucleasa microcócica (Roche Applied Science) durante 30 min. La reacción se detuvo poniendo las muestras en hielo y añadiendo 100 mM EDTA en una proporción 1/10 respecto al volumen final. Con el fin de

revertir el efecto del formaldehído, los núcleos se incubaron a 65°C durante 2 horas con proteinasa K (50 µg/ml). Finalmente, se extrajo y se purificó el DNA por el método fenol-cloroformo y se precipitó con etanol. El sedimento de DNA se resuspendió en 100 µl de tampón TE y se incubó con 5 mg/ml de RNasa A durante 1 hora a 37°C. El DNA mononucleosomal se extrajo mediante separación de los sedimentos de DNA en gel de agarosa, excisión de la banda y purificación del DNA con el kit GenClean de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El DNA mononucleosomal, se analizó mediante qPCR usando *primers* (**tabla II**) que amplifican pequeños fragmentos que cubren una región comprendida entre 0 y +600pb desde el sitio de inicio de la transcripción (TSS) de los genes. Así pues, las secuencias amplificadas corresponderían a aquellas regiones en las que haya un nucleosoma protegiendo al DNA de la degradación por la nucleasa. Para normalizar cada amplicón, en la reacción de qPCR se incluyó la muestra procedente del *input* (un alícuota de muestras fragmentadas aleatoriamente hasta obtener el tamaño mononucleosomal por sonicación). Los experimentos se repitieron al menos tres veces.

XI.1. Nuc-ChIP assay.

Los mononucleosomas obtenidos mediante digestión con MNasa se inmunoprecipitaron con anticuerpos frente a histona H3 o Pol II siguiendo el protocolo descrito anteriormente para el ChIP

assay. La detección del DNA inmunoprecipitado se llevó a cabo por qPCR (las secuencias de cebadores se muestran en la **tabla II**).

Tabla II

Primer	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
qChIP/C-myc	GATTCTCTGGCTAATCCCCG	TCCAGAGCTGCCTTCTTAGG
qChIP/Ep400	CTGCTTAAGAAGCCGCTTCG	AGAAAGAACGGCGCACTCGA
qChIP/Jmjd6	CCCAATTGGCGTGCATGAAG	CTCGTAGTAGTAGTTGTGCCGGG
qChIP/Lsm1l	AGTACGAGAGCTTCTGAAG	GCATCCGCGTAAGCACATT
qChIP/Suv39h2	AGGGTGAGCAGGAAAGCACA	AGGCACCAGGGGATTCCCTTT
Jmjd6 +103	TGTTCCGCCAACCCAAAGCTC	GCGCCTTTAAAGTCGCCTTCCA
Jmjd6 +153	TGGCGGCTGAGGAGTGAATCT	TCGCGTTTCTGCCACCAA
Jmjd6 +240	GTTTGGTGGCAGGAAACGCGA	GCGGATGCGCTTCTTGCTCTTG
Jmjd6 +290	AGCGGCTCACGATGAACCA	TCCAGTCGAGCGAGTCTTGA
Jmjd6 +365	ACCACAAGAGCAAGAAGCGCAT	TTCAGCGGGTAGCTCTCGTAGT
Jmjd6 +384	TCGACTGGACCCGGCACAA	GACCAGCGGCCCTCGGAA
Jmjd6 +494	AGCCCGGCTGTCAAACTCG	CGGAGCCACCCCTTACAG
Suv39h2 +97	CCAAGGCACGGGGCAGTGA	TCGCCGTTCCGCTGGCCTT
Suv39h2 +172	AGGCCCAAGGCCAGGCGAA	CTCCGGACCACGCTCGCT
Suv39h2 +262	AGCGAGCGTGGTCCGAGCT	GCCGAGCGCGTGTGCTTTC
Suv39h2 +294	CGAGTGTGCACGAGGTGCCTTA	TCGGAGGTGGCGACCGCTA
Suv39h2 +340	AGGGTGAGCAGGAAAGCACA	AGGCACCAGGGGATTCCCTTT
Suv39h2 +417	TGCGGTGCTGGAGAAAGGGAAT	CCCAAAGTTTCCCGGAGCTCA
qChIP/arntl	AGAAATCCACAGAGCGTGCC	CTACTTCCGACCAATCCGC
qChIP/canx	AAATCAGGAAACAGCACGGG	TTCCGACCAATTGAGTTAGG
qChIP/capn1	TACCGTTTGTCTAGCGTCCG	GGGGTATTTTTAACTAGGGCC
qChIP/capn2	AGATGGACACACCAGTAGCC	ACGAACAATCGCAAGTTGGG
qChIP/ccnd3	TGTGCCTCAGTATCATGGTC	TGGAATGCTCCTACGTACA
qChIP/creb1	TAAAACTCCAGCGAGATCCG	CCGCCATTATTCTTTGTTCGC
qChIP/ctsl	GTTATGCAACTCTCCACCT	CTCAGGCTTTAAAGCCTCTC
qChIP/e2f3	AGGAGAGACTTGAAACTCC	TGAGATCTGGATGTACGTG
qChIP/e2f5	AAAGAGCTGGGGGTCTACTT	CCGAGTTTAAATGGCAGGAAG

qChIP/flna	GCTGAGTTGCTTTTGCGGA	GAGAGCTCATTTTGAGGC
qChIP/foxo3	AAAAGACGGGAGTTGCCCGC	GGAGACGCGAGCGAATCGAC
qChIP/htra2	TTACCGGTGCGAGTCAAAGAG	ATGCCGGGAAACGTAGTCCC
qChIP/mbp	TTGTGTCAAAGAAGCAGCG	AGAGGTCTAAATGGCATCGC
qChIP/mpo	CAGCGAATGACAAGTATCGC	CATCTTCATACTCTGCAGGC
qChIP/pias1	AAATAGTGCGTGTGGGTCTC	CTCAACTCCAGACTCGGGT
qChIP/rarg	ATCCTTGAAACCCACTGGA	TCAGCATCTCAAATGGTGGC
qChIP/ripkl	AGTAGTCCTTAGAGGAGGAC	AGCTTCTGAGGAAACTAGCG
qChIP/runx3	ACTTCTTTCTGCCACAGACCC	TAATTTCCAGGATCGCGCAGG
qChIP/stat5a	GGCTACTATGGACTTCTGCC	CGTTCCTGGTTCTCGCC
qChIP/tle1	CGCGTGTTAATGTAAGCGG	TTAGCAAAGGGCTGACCAG
qChIP/trp73	AACACTCTGCAGTGCCACTAA	GACTCTTCAAAGTCCAGCCA
qChIP/uchl1	GGTGCCATTATTTGTCTGG	CACAACACTGCGTATCCACT
qChIP/cmyc	GGGTACATGGCGTATTGTGT	AGACCCCGGAATATAAAGG
Pol II ChIP/capn1	TAGTGTTGAGAGTCACACCC	ACTGAAGGATTTGGGAAGCG
Pol II ChIP/capn2	CTAGGACAGAACTCAAAGGG	CGTTTCATAGTCAGACCTCC
Pol II ChIP/ctsl	TGACTCCTGTGAAGAACCAG	GAGATCCTGTCTCATTGAGG
Pol II ChIP/flna	GCACTATTCATCTCAATGCC	CTTCACTTTAAACCAAGCACCC
Pol II ChIP/mbp	ATCCAGAACAATGGGACCTC	TCCATGGTACTTGCTGTGGC
Pol II ChIP/mpo	TGATAGTGCCAAAAGGAGGG	CTTGAAGCAGTTTTGCCAG
Pol II ChIP/rarg	ATCCTTGAAACCCACTGGA	TCAGCATCTCAAATGGTGGC
Pol II ChIP/runx3	CCTCAGCAGTAAACAGAGAG	TGCAGATCTGGAGTGAGCGGA
Pol II ChIP/trp73	GCTCCTGTAACAAGACACC	TAGTCGGTATTGGAAGGGA
Pol II ChIP/uchl1	AAGGATCCCACTTCTTAGGG	TTGACTTAAGCAAGCCAGGC

Tabla II. Listado de primers utilizados en los análisis de ChIP assays y posicionamiento nucleosomal. Se proporciona la secuencia de cada pareja de primers para cada amplicón. En los primers utilizados para el análisis de posicionamiento nucleosomal, el número indica la posición central del amplicón respecto al TSS.

XII. ChIP/chip.

Se realizó la técnica ChIP/chip para identificar todos los sitios donde interaccionan las proteínas p65, p300, Id2 o E2F4 en los promotores de todo el genoma *in vivo*.

XII.1. Amplificación y etiquetado del cDNA.

Se realizaron tres ensayos de *Chip assay* (**explicado en apartado X.5**) independientes por cada condición, glándula mamaria de 48 horas de involución tras la lactancia o tejido hepático murino adulto. Tras la realización de los *Chip assay*, se realizó una PCR ligada de los fragmentos de DNA inmunoprecipitado. Brevemente, mediante la acción de la DNA polimerasa del fago T4, se generaron fragmentos de cromatina con extremos romos. A continuación, se añadieron adaptadores de secuencia conocida o *linkers* a todos los extremos de los fragmentos de DNA inmunoprecipitado. Este DNA se amplificó mediante PCR, utilizando cebadores complementarios a los adaptadores. Posteriormente, se realizó una purificación del cDNA por columna (GeneChip Sample Cleanup Module, Affymetrix). Finalmente, se utilizó 1 µg del DNA amplificado para la reacción de fragmentación y marcaje mediante el kit comercial de Affymetrix (GeneChip WT Double-Stranded DNA Terminal Labeling Kit).

XII.2. Microarray.

Se utilizaron *arrays* de promotores (Affymetrix Mouse Promoter 1.0R Array) que contienen alrededor de 28.000 genes conocidos de todo el genoma de ratón. Los promotores génicos se encuentran centrados en la región que cubre de -6 a +2.5 kb con respecto al TSS (sitio de inicio de la transcripción) con una resolución media de 35pb. La hibridación de los *arrays* de promotores se realizó según el protocolo recomendado por Affymetrix. Brevemente, después de unas 16 horas de hibridación a 45°C, se eliminó el cóctel de hibridación, se hicieron varios lavados y se tiñeron los arrays en una estación de fluidos Affymetrix GeneChip 450. Posteriormente, se digitalizaron los arrays mediante un Escanner 3000 7G (Affymetrix, Santa Clara, CA, EE.UU.). Finalmente, se generaron los archivos CEL. mediante el uso del programa “GeneChip Operating Software” provisto por Affymetrix.

La calidad de los datos obtenidos de los microarrays (3 arrays independientes para cada inmunoprecipitado y 3 arrays para sus respectivos *inputs*) se analizó utilizando los programas Affymetrix Tiling Analysis Software y R/Bioconductor. La intensidad de los datos crudos se representó gráficamente, indicando que el enriquecimiento de cromatina para cada proteína inmunoprecipitada era óptimo en todos los casos.

XII.3. Análisis de los datos.

El análisis de los archivos CEL. se realizó mediante una comparación exhaustiva por parejas de muestras inmunoprecipitadas frente a inputs con el programa ChipInspector. Para analizar la significación estadística del algoritmo de los microarrays se realizó un t test único a nivel de una única sonda tal y como se ha descrito previamente (Tusher et al. 2001). Basándonos en nuestra experiencia con Affymetrix GeneChip Mouse Promoter Array, se fijó como ajuste estándar para los análisis un mínimo de tres sondas consecutivas en una ventana de 300pb.

El algoritmo estadístico de ChipInspector crea un fondo de datos artificiales mediante la permutación al azar de los resultados del *array*. A cada sonda se le concede un valor basado en su cambio relativo respecto a la desviación estándar de las medidas tomadas repetidamente para dicha sonda. Las sondas con valores más altos de un cierto umbral o valor Delta, serán consideradas como significativas. Las permutaciones del conjunto de datos serán entonces utilizadas para estimar el porcentaje de sondas identificadas por casualidad con idéntico valor Delta. Por lo tanto, para cada umbral Delta existirá una relación de sondas significativas y sondas falsamente positivas. Esta relación o *False Discovery Rate* (FDR), será el indicador de astringencia. En nuestros análisis se seleccionó siempre un valor de Delta altamente astringente (FDR=0) con objeto de disminuir el número de posibles falsos positivos. Aunque esta aproximación disminuyó el número de

sondas detectadas, el peligro de obtener falsos positivos entre dichas sondas también disminuyó drásticamente. Este análisis dio como resultado 15879 sondas positivas significativas para p65, 61918 para p300, 9307 para E2F4 y 871 para Id2.

Mediante el programa RegionMiner (Genomatix) se realizaron los análisis de promotores de aquellas regiones que resultaron enriquecidas en el análisis por ChipInspector. Para crear subgrupos por categorías a partir de estos genes, se utilizó el programa GePS. Este programa combina anotaciones genómicas con datos encontrados en la literatura. Las secuencias que flanquean los TSS se extrajeron utilizando el módulo Gene2promoter del Genomatix Software Suite.

XIII. Ensayos *in vitro* de fragmentación de proteínas mediada por calpaínas.

Para confirmar si la fragmentación de proteínas observada durante la involución de la glándula mamaria estaba mediada por calpaínas, se realizaron experimentos con calpaína recombinante. Concretamente se incubaron 100 µg de extracto total de proteínas de glándula mamaria en el pico de la lactancia con concentraciones crecientes de calpaína 1 recombinante (C6108, Sigma) y 0.5 mM de Ca²⁺, durante 30 min a 37°C. El mismo experimento se realizó para el ensayo con calpaína 2 (208718, Calbiochem), pero en este caso, suplementando con 5 mM de Ca²⁺. Finalizada la incubación, mediante *Western blot* se

analizaron los niveles de las posibles proteínas diana, así como la de los fragmentos generados.

La especificidad de la fragmentación de proteínas mediada por calpaínas se analizó mediante el mismo tipo de ensayo en presencia o ausencia de diferentes inhibidores de calpaínas: 50 μ M de calpeptina, un inhibidor específico de calpaínas, con 100 μ M de *calpain inhibitor VI* o con 100 μ M de ALLN (Calbiochem), ambos inhibidores tanto de calpaínas como de catepsinas.

XIV. Ensayos de silenciamiento génico con siRNA.

Las células NMuMG se sembraron a una densidad de 5200 células/cm². Tras 24h de cultivo, a una confluencia aproximada del 60%, se realizaron las transfecciones utilizando el reactivo lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una dilución de lipofectamina 1:50 en Opti-MEM (Invitrogen) se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 50 nM de siRNA de calpaína 1 (EMU057001-50UG, SIGMA) o de calpaína 2 (EMU080871-50UG, SIGMA), o siRNA no relacionado (EHUEGFP-50UG, SIGMA), en 250 μ l de vehículo (Opti-MEM). Tras 20 minutos de incubación, las células se transfectaron con dicho coctel (dilución 1:4) y a las 24 horas de transfección, se reemplazó el medio Opti-MEM que llevaba la lipofectamina, por medio nuevo DMEM. Tras 48 horas, se realizaron varios lavados con PBS1X y se recogieron las células con ayuda de un *scraper*. Finalmente se extrajeron proteínas como se

ha explicado anteriormente. La efectividad de la transfección, se analizó mediante un *Western blot* de Calpaína 1 o 2, observándose una disminución de aproximadamente el 80% de la proteína respecto al control.

XV. Análisis estadístico.

Los resultados presentados en las gráficas corresponden a la media aritmética de los valores obtenidos en cada experimento \pm el error estándar de la media (SEM), de al menos tres experimentos independientes.

En los experimentos en los que sólo se compararon las medias de dos poblaciones distribuidas de forma normal, se utilizó la prueba *t-Student*. Aquellos grupos de datos en los que existían diferencias significativas se indicaron mediante asteriscos (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$).

Para el análisis de expresión génica *in silico*, donde se compararon dos poblaciones con una distribución no normal, se utilizó la prueba de Mann-Whitney. Los resultados se presentaron con un diagrama de cajas y bigotes.

Por otro lado, para el estudio de los resultados obtenidos de los diferentes CHIP/chip realizados en este proyecto de tesis, se realizó un análisis estadístico más exhaustivo. Dicho análisis está explicado en el apartado XII. 3 de materiales y métodos.

RESULTADOS

I. **NF-κB como nodo de regulación de redes transcripcionales durante la involución de la glándula mamaria.**

Se ha descrito que, tanto la expresión como la actividad del factor transcripcional NF-κB, aumenta en la glándula mamaria durante el embarazo, cae en la lactancia, y aumenta de nuevo en la involución del tejido mamario (Brantley et al. 2000). Nuestro laboratorio había demostrado previamente un aumento de la expresión de la iNOs modulada por NF-κB en glándula mamaria tras el destete con el consiguiente aumento en los niveles de NO (Zaragozá et al. 2005). Nuestros estudios proteómicos identificaron a la catepsina D como diana del NO, mostrándose cómo la nitración de esta proteasa modulaba su actividad enzimática en la segunda fase de la involución, donde esta proteasa participan en la degradación de la matriz extracelular y la membrana basal durante la remodelación de la glándula mamaria (Zaragozá et al. 2007; Zaragozá et al. 2009). Finalmente, nuestro grupo demostró cómo las cascadas de señalización que desencadenan la involución, tales como la vía de NF-κB estaban retrasadas en los ratones knockout para el gen de la iNOS y consecuentemente, la involución de la mama aparecía también retrasada (Zaragoza et al. 2010). Este patrón temporal sugiere que NF-κB no sólo juega un importante papel durante el embarazo, sino que resulta clave para la involución de la glándula mamaria, constituyendo un posible nodo de regulación transcripcional. Este nodo podría coordinar los distintos procesos biológicos que se suceden en un proceso secuencial como

es la involución de la mama. Con el fin de profundizar en el papel que desempeña NF- κ B en la involución tras el destete, nos propusimos identificar aquellos genes que pudieran estar modulados por NF- κ B, mediante experimentos CHIP/chip de la subunidad p65 (RelA) y su coactivador p300.

I.1 Identificación de los genes diana de NF- κ B en la involución de la glándula mamaria de ratón mediante análisis de CHIP/chip.

Con el fin de identificar los genes diana de NF- κ B durante el proceso de involución de la glándula mamaria, se realizó un análisis CHIP/chip en glándula mamaria de ratón a las 48 horas tras el destete. Se eligió este tiempo de destete por ser el punto en que se observa un mayor aumento de la actividad de NF- κ B (Zaragozá et al. 2005).

Con objeto de validar los anticuerpos a usar en el CHIP/chip, se analizó mediante *CHIP assay* la unión de p65 al promotor del gen *c-myc*, un gen diana de NF- κ B (Kirillova et al. 1999, Bourgarel-Rey et al. 2001), en muestras de glándula mamaria murina en el pico de la lactancia y a las 48 horas tras el destete. Como control positivo se utilizó el anticuerpo anti-E2F4, por ser un factor de transcripción cuya unión al promotor de *c-myc* se ha demostrado previamente (Torres et al. 2009). Como se muestra en la **figura 10**, p65 sólo se unió a la región promotora de *c-myc* en las muestras de 48h tras el destete. Además, en ambos casos se observó unión de E2F4 y

ausencia de amplificación en las muestras inmunoprecipitadas con IgG de suero normal, confirmando la validez del anticuerpo para la inmunoprecipitación de cromatina.

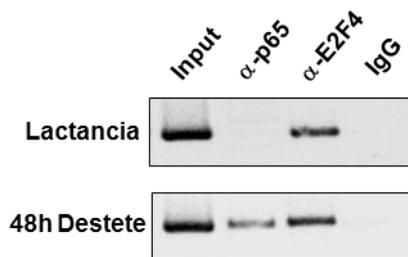


Figura 10. Validación del anticuerpo p65 para experimentos de CHIP/chip. Análisis por CHIP assay de la unión de p65 al promotor de *c-myc* en muestras de glándula mamaria en el pico de la lactancia y a las 48h tras el destete.

Tras la inmunoprecipitación de cromatina, se realizó un *array* de promotores cubriendo regiones de aproximadamente 28000 promotores conocidos de todo el genoma de ratón. Para identificar los posibles sitios de unión de p65 a promotores de todo el genoma, se utilizaron muestras de glándula mamaria de 48 horas de involución.

Tras la realización del Chip/chip, se realizó un análisis bioinformático de los archivos CEL. mediante comparación exhaustiva por pares de las muestras inmunoprecipitadas frente a los inputs. Como se ha mencionado en el apartado de Materiales y Métodos correspondiente, con objeto de disminuir el número de posibles falsos positivos, en nuestros análisis se seleccionó un valor de Delta o umbral de significación estadística altamente astringente (FDR=0). La curva resultante de este análisis (**Figura 11**) muestra la

cantidad de sondas que se desvían de la señal de fondo y constituye un importante control de especificidad para nuestros experimentos.

En el análisis bioinformático de los CHIP/chip se obtuvieron 15879 sondas positivas con significación estadística, que corresponden a 4532 genes diana para p65 (los datos crudos se pueden encontrar en el CD adjunto y en el siguiente vínculo web: <http://www.uv.es/eruiz/>).

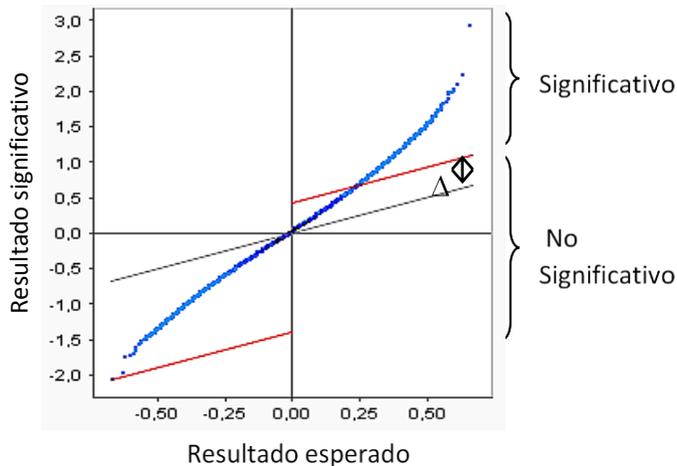


Figura 11. Curva de significación estadística del CHIP/chip de p65. Los gráficos muestran los valores observados (= reales,) en el eje de las Y, respecto a los valores esperados (= fondo), en el eje X. Las funciones con valores de desviación $> \Delta$ representan el enriquecimiento de p65 en glándula mamaria de ratones en comparación con el DNA genómico total.

I.2 Análisis funcional de los genes diana de p65.

Aplicando el Gene Ontology (GO) del programa GePS (Genomatix) se agruparon funcionalmente el conjunto de genes diana de p65 (**Figura 12**). Los porcentajes mostrados en la **figura 12** se refieren al número de genes diana dentro de una categoría particular en relación con el número total de genes diana que tienen una anotación GO. Generalmente, los genes unidos por p65 estaban comprendidos dentro de categorías con funciones moleculares relacionadas con actividad catalítica, unión a ácidos nucleicos, proteínas de unión a iones y transporte (**Figura 12A**). Por otro lado, los genes a los que se unió p65, se distribuyeron en distintas categorías de acuerdo a sus funciones biológicas (**Figura 12B**). Nuestros resultados mostraron que p65 se unía preferentemente a genes relacionados con el metabolismo del nitrógeno, la señalización celular, el desarrollo y la expresión génica. Confirmando, de ese modo, el importante papel que desempeña NF- κ B en la glándula mamaria. Es de destacar, y teniendo en cuenta que a veces un gen puede ser asignado a más de una categoría, que el 14% de los genes diana de p65 se incluían dentro de la categoría de proliferación, muerte celular o procesos inflamatorios.

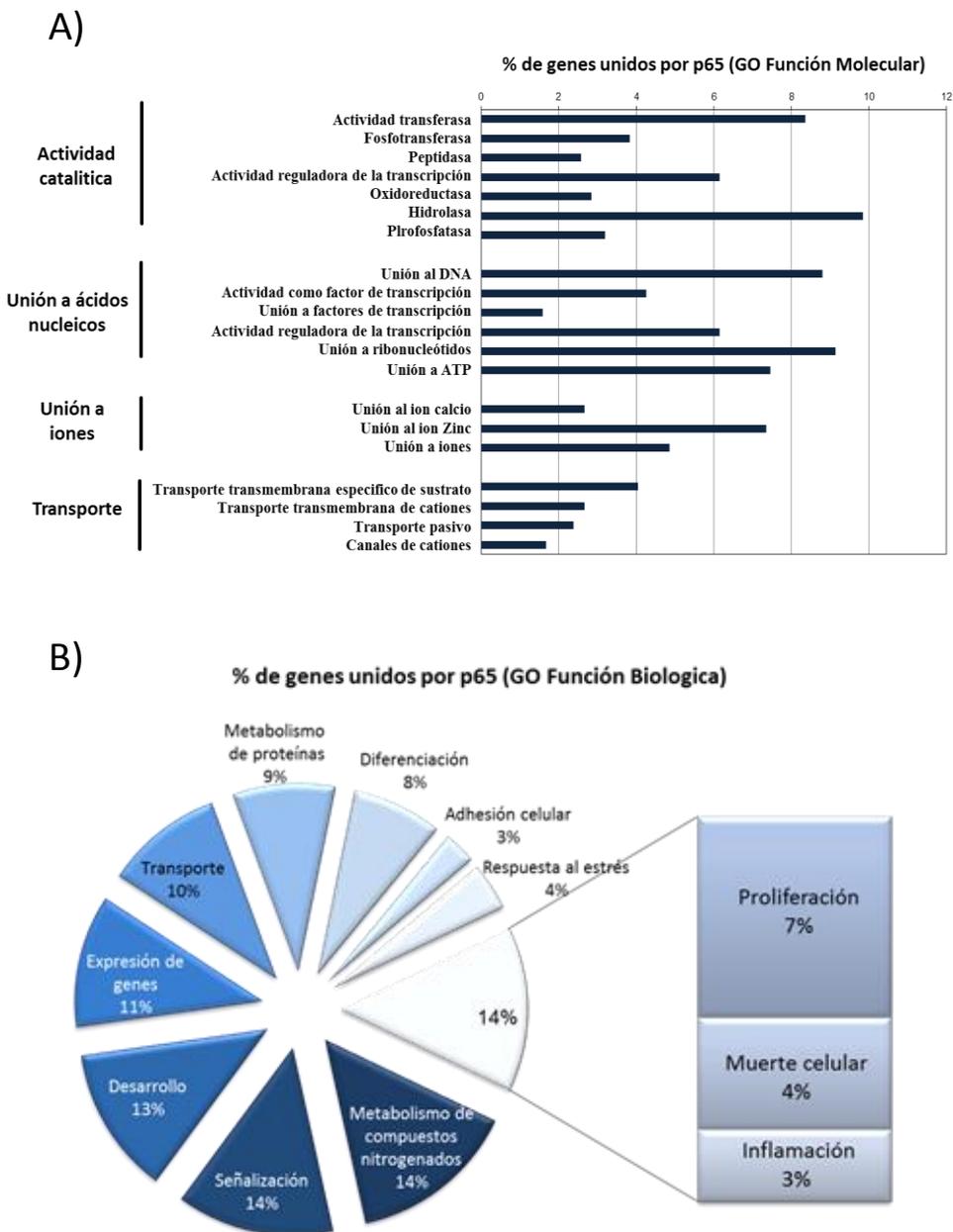


Figura 12. Distribución de la función molecular y biológica GO de los genes diana de p65. A) Clasificación según su función molecular. B) Distribución GO de los procesos biológicos de los genes diana de p65. En algunos casos, un gen se asigna a más de una categoría. Las agrupaciones se representan como porcentaje del número de genes englobados en una categoría particular, en relación al número total de genes a los que se une p65.

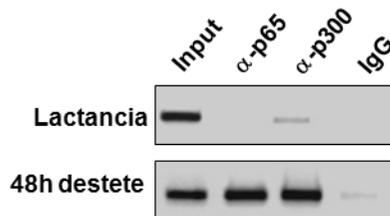
I.3 Identificación de los genes diana de NF- κ B transcripcionalmente activos mediante ChIP/chip de p65/p300.

La unión de p65 a los promotores de sus genes diana no significa, necesariamente, que los genes estén transcripcionalmente activos. Se ha descrito que la actividad transcripcional de p65 depende de su asociación a CBP/p300 (Calao et al. 2008). Como se ha mencionado en la introducción, después de la unión de p65 a los promotores, este recluta a su coactivador CBP/p300 que induce la acetilación de histonas, facilitando la descondensación de la cromatina y el acceso de la maquinaria transcripcional a las regiones promotoras de los genes para iniciar la transcripción. Por lo tanto, con el fin de seleccionar genes transcripcionalmente activos regulados por NF- κ B, se realizaron experimentos de ChIP/chip con anticuerpos específicos para p300 y p65 de ratón.

Como en el caso anterior, primero se validó el anticuerpo p300. Para ello, se realizó un *ChIP assay* en muestras de glándula mamaria en el pico de la lactancia y a las 48 horas tras el destete, con primers del promotor de c-myc. Como se muestra en la **figura13a**, p300 se unió preferentemente a la región promotora de c-myc en las muestras de 48h tras el destete. Además, en ambos casos se observó ausencia de amplificación en las muestras inmunoprecipitadas con IgG de suero normal. Por otra parte, para validar que el gen seleccionado estaba transcripcionalmente activo, se analizó la expresión de c-myc por RT-qPCR en glándula mamaria

de ratón a las 48 horas de destete. Como se muestra en la **figura 13b**, la expresión de c-myc se incrementaba a las 48 horas tras el destete. Estos resultados sugieren que la inmunoprecipitación de cromatina con los anticuerpos de p65 y p300 estaba seleccionando genes transcripcionalmente activos.

A)



B)

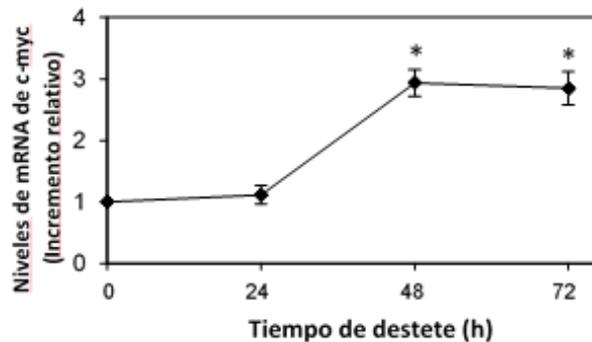


Figura 13. Validación del anticuerpo anti P300 para ChIP/chip y expresión de c-myc tras el destete. **A)** Análisis de la unión de P300 al promotor de c-myc por ChIP assay en muestras de la glándula mamaria en el pico de lactancia (control) y tras el destete de 48h. Anticuerpos Anti- p65 o IgG de suero normal se utilizaron como control positivo y negativo, respectivamente. **B)** Análisis mediante RT-qPCR de los niveles de expresión de c-myc a diferentes tiempos de involución. Los datos se normalizaron respecto a la expresión de 18S. Los niveles de expresión se muestran como un incremento relativo a los controles en el período de lactancia. Los resultados de la RT-qPCR se presentan como el promedio \pm SEM ($n = 4$). * P-valor < 0.05 .

Se realizaron, por tanto, experimentos de ChIP/chip con anticuerpos anti-p300 en muestras de glándula mamaria a las 48h de involución y se analizaron como en el caso de los ChIP/chip de p65.

Al igual que en el caso anterior, en el análisis bioinformático se aplicó un valor de FDR del 0% (**Figura 14**). A continuación, tras el análisis de al menos tres experimentos independientes, se encontraron 61918 sondas positivas, que correspondían a 10322 genes diana de p300 (los datos en crudo están disponibles en el vínculo web: <http://www.uv.es/eruizy/> y en el CD adjunto).

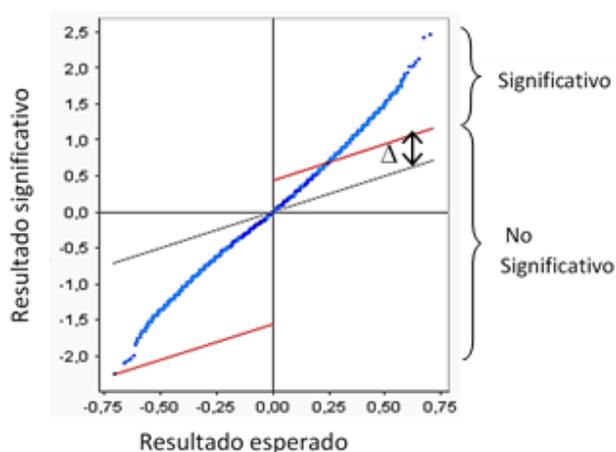


Figura 14. Curva de significación estadística del ChIP/chip de p300. Los gráficos muestran los valores observados (= reales,) en el eje de las Y, respecto a los valores esperados (= fondo), en el eje X. Las funciones con valores de desviación $> \Delta$ representan el enriquecimiento de p300 en glándula mamaria de ratones en comparación con el DNA genómico total.

Para conocer los genes diana de p65 transcripcionalmente activos, se cruzaron los datos de los experimentos del ChIP/chip de p300 con los datos de p65, encontrándose un solapamiento limitado de 268 genes diana que unían tanto p65 como p300 (**Figura 15**) (los datos crudos se encuentran en el CD adjunto y en el siguiente vínculo web: <http://www.uv.es/eruizy/>). Estos genes representan, probablemente, los genes diana de NF- κ B transcripcionalmente activos. Por otro lado, como se esperaba, p300 se unió a un gran número de genes no relacionados con NF- κ B. De hecho, se ha descrito que p300 es un coactivador de una gran variedad de factores transcripcionales, tales como CREB, STAT3, AP-1, etc (Vo & Goodman, 2001). Finalmente, se encontró que p65 se unía a 4532 genes a los que no se unía p300 (estos genes serán denominados de ahora en adelante genes diana de p65-sólo).

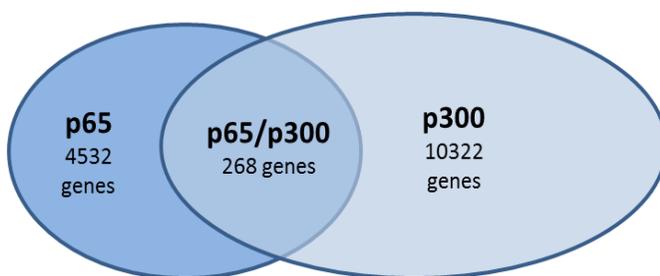


Figura 15. Diagrama de Venn de los genes diana de p65 y p300 identificados mediante ChIP/chip. Los genes diana se obtuvieron como resultado de tres experimentos independientes de ChIP/chip para cada anticuerpo en muestras de glándula mamaria de ratón tras 48h de destete. El solapamiento de diagramas indica los genes a los que se unen simultáneamente p65 y p300.

I.4 Posible papel de NF- κ B como nodo de coordinación de diferentes procesos biológicos durante la involución de la glándula mamaria.

Para determinar un posible papel de NF- κ B como nodo de regulación durante la involución de la glándula mamaria, los genes que unían p65/p300 fueron en primer lugar agrupados y clasificados según su implicación en diferentes funciones moleculares y posteriormente según su relación con diferentes procesos biológicos.

I.1.1. Funciones moleculares de los genes diana de p65/p300.

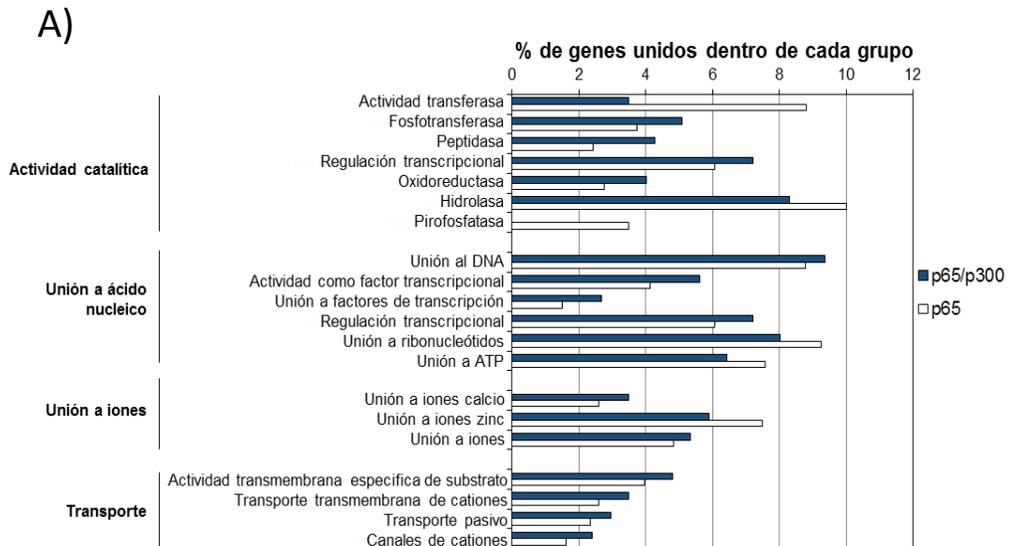
Como se muestra en la **figura 16a**, los genes diana de p65/p300, cuando se compararon con los de p65-sólo, estaban enriquecidos en funciones moleculares relacionadas con la actividad fosfatasa, peptidasa u oxidorreductasa, en la unión a iones de calcio, el transporte transmembrana y en la regulación de la transcripción. Este perfil está de acuerdo con los datos en la literatura en los que se describe que durante la remodelación de la glándula mamaria tras el destete, aumentan el estrés oxidativo, el metabolismo del Ca²⁺ y la actividad de proteasas (Wiesen & Werb, 2000; Zaragoza et al, 2005; Zaragoza et al. 2009). Estos datos sugieren que NF- κ B podría estar implicado en la regulación de genes fundamentales para el *output* final de la involución de la mama. Sin embargo, es aún más destacable el hecho de que

p65/p300 además se uniera a genes que codifican factores de transcripción. Este resultado apoyaría la idea de NF- κ B como nodo de regulación transcripcional, o dicho de otra forma, como plataforma molecular de amplificación de señales durante la involución de la mama.

1.1.2. Funciones biológicas de los genes diana de p65/p300.

Como ya se ha comentado en la introducción, las vías de señalización que se desencadenan en respuesta a estímulos pro-inflamatorios, apoptóticos o proliferativos, comparten con frecuencia proteínas clave. La confluencia y la sinergia entre señales comunes y aquellas que son específicas, favorecería en última instancia que se desencadene preferentemente un determinado proceso biológico u otro. NF- κ B podría tener un papel clave como factor de coordinación de señales confluentes que se desencadenan en la involución de la mama.

Si esta hipótesis fuera cierta, cabría esperar que p65/p300 se uniera preferentemente a genes incluidos dentro de una categoría biológica concreta. Como se representa en la **figura 16b** dicho análisis reveló que los grupos más representativos serían los relacionados con la transducción de señales, la regulación de procesos metabólicos, y la respuesta a estímulos. Procesos, todos ellos, demasiado generales como para poder extraer ninguna información concluyente. Este hecho no es sorprendente dado que, en este tipo de análisis, un mismo gen puede incluirse dentro de varias categorías biológicas distintas.



B)

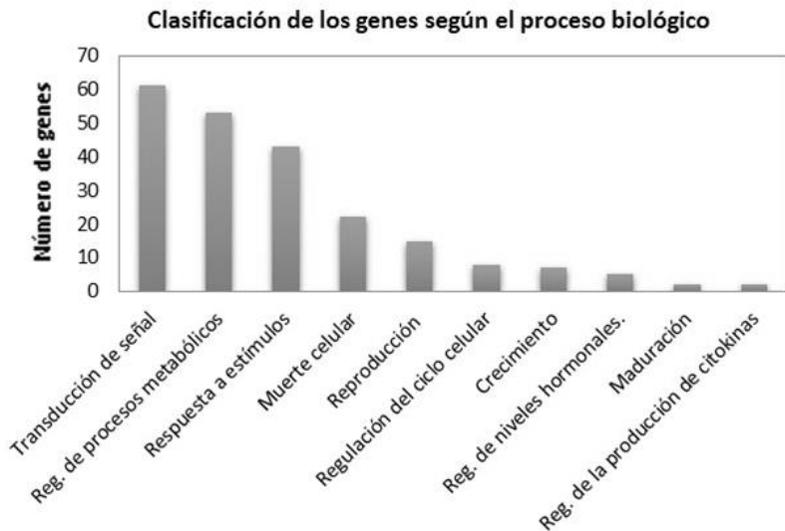


Figura 16. Clasificación molecular y biológica de los genes diana de p65/p300. A) El histograma muestra la distribución de las funciones moleculares de los genes que unen p65/p300 (negro) o solo p65 (gris), frente al total de genes unidos por p65. **B)** Número de genes diana de p65/p300 englobados dentro de los procesos biológicos más importantes en los que se han descrito.

Previamente se había observado que la totalidad de p65 se unía a un mayor número de genes relacionados con la proliferación celular que a genes relacionados con la muerte celular o la inflamación (**Figura 12b**). Se abordó, por tanto, el análisis de funciones biológicas siguiendo una aproximación distinta, limitada a estas tres categorías. Se estudió si los genes diana de p65/p300 quedaban sobre-representados en alguna de estas tres categorías biológicas (proliferación, muerte celular o inflamación) comparados con la totalidad de genes que unían p65. Además, los genes se agruparon de forma exhaustiva y única para cada categoría.

Como se muestra en la **figura 17**, los resultados de este análisis mostraron que los genes diana de p65/p300 estaban más enriquecidos en funciones biológicas relacionadas con la respuesta inflamatoria y la muerte celular (La lista de genes diana de p65/p300 y p65 relacionados con inflamación se pueden encontrar en el CD adjunto y en el siguiente vínculo web: <http://www.uv.es/eruizy/>). Por lo tanto, durante la involución de la glándula mamaria, NF- κ B transcripcionalmente activo parece estar participando preferentemente en la regulación de genes relacionada principalmente con la inflamación y la apoptosis.

I.5 Cooperación de elementos en los promotores a los que se une p65/p300.

Los estudios sobre la regulación transcripcional de genes pro-inflamatorios se han centrado principalmente en el análisis de los

promotores proximales. Se ha demostrado que en las regiones más próximas al TSS se encuentran elementos clave para la regulación transcripcional de estos genes (Smale, 2010). Además, la transcripción de los genes modulados por NF- κ B podría requerir la proximidad física de factores de transcripción adicionales, pertenecientes a la misma matriz de familia o a una diferente. Analizamos por tanto la posible contribución de cada uno de estos posibles elementos a la regulación transcripcional de los genes diana de p65/p300:

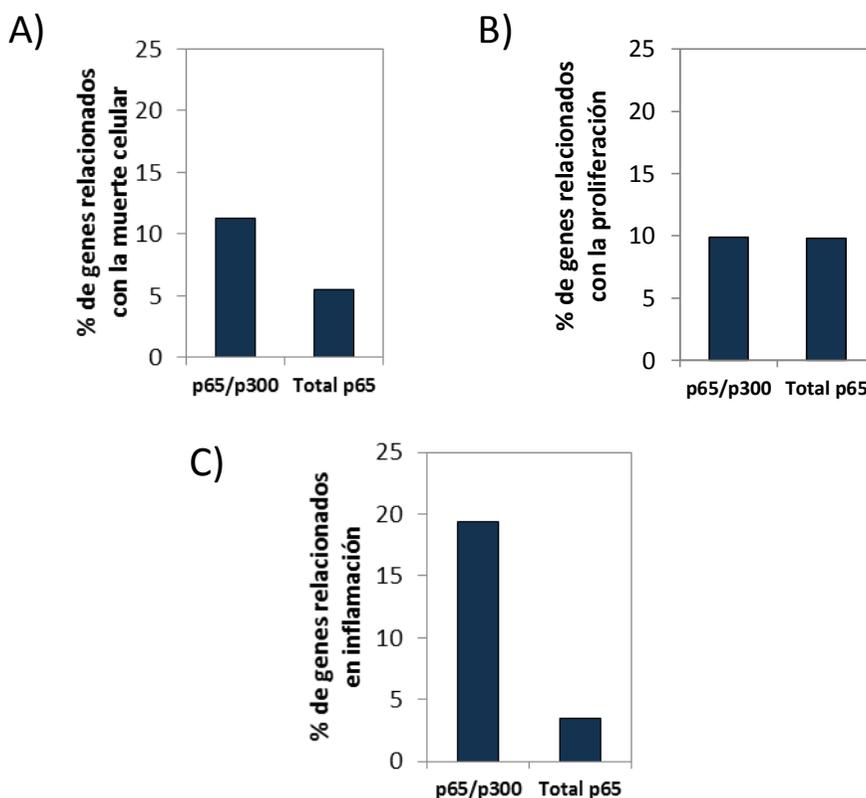


Figura 17. Porcentaje de genes unidos por p65 o p65/p300 incluidos en un proceso biológico. A) Muerte celular. B) Proliferación celular. C) inflamación. Los porcentajes de los genes se calcularon como el número de genes incluidos en un proceso biológico frente al número total de genes para esa categoría en el grupo indicado. Los valores de p para el grupo de p65/P300 fueron $1,57 \cdot 10^{-8}$ (muerte celular), $3,60 \cdot 10^{-7}$ (proliferación) y $3,79 \cdot 10^{-8}$ (inflamación).

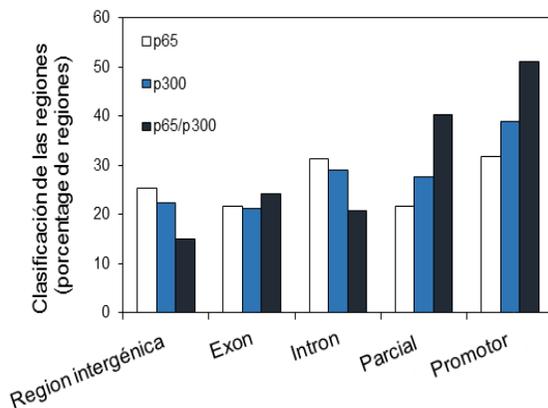
I.5.1. Análisis de la localización genómica de p65/p300.

Dado que entre todos los genes a los que se unía NF- κ B, sólo un pequeño grupo de estos estaban siendo transcripcionalmente activos, se analizó la posible preferencia de unión de p65/p300 a una región en particular en comparación con los genes que unen p65. El análisis de localización de estos factores en todo el genoma, mediante el programa RegionMiner (Genomatix), reveló que p65/p300 se unía a los promotores de los genes diana en un mayor porcentaje (51 %) que la totalidad de p65 (31 %) (**Figura 18a**). Por el contrario, la totalidad de p65 se unía a un mayor número de regiones incluidas en secuencias intrónicas. No obstante, la distribución global en el genoma (analizado como enriquecimiento de regiones unidas por un factor comparado con todo el genoma) seguía el mismo patrón para la totalidad de p65 o para p65/p300 (**Figura 18b**). Por lo tanto, no podemos concluir que NF- κ B transcripcionalmente activo se una preferentemente a una región en particular en el genoma.

I.5.2. Distancia de unión de p65/p300 respecto al TSS.

Con el fin de definir de una manera más precisa los mecanismos por los cuales p65/p300 se une a determinados genes, se analizó la correlación entre la unión de p65, p300 o p65/p300 a los promotores, y la distancia del elemento de unión respecto al TSS.

A)



B)

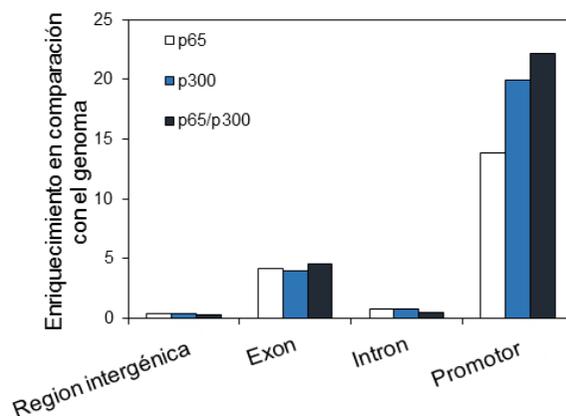


Figura 18. Clasificación de regiones que unen p65, p300 y p65/p300 en la totalidad del genoma de ratón. Mediante el programa RegionMiner se determinó la localización del sitio de unión de p65 (barras blancas), P300 (barras azul claro) y p65/p300 (barras azul marino) en forma de porcentaje de regiones respecto a todo el genoma (**panel A**) y regiones enriquecidas para cada factor en comparación con el genoma (**panel B**). Se han clasificado un total de 20.000 y 947 regiones para P300 y p65/p300 respectivamente.

Como se muestra en la **figura 19**, p65 presentaba una distribución de correlaciones más dispersa, con múltiples sitios de unión a ambos lados del TSS sobre la región que se extiende de -1000 a +1000pb. La media de correlaciones para la totalidad de genes que unían p65 fue de 1075 ± 377 con una distancia más

frecuente de +93pb desde el TSS. Sin embargo, las correlaciones para p65/p300 con una media de 328 ± 175 se encontraban concentradas y restringidas a una ventana mucho más estrecha, fundamentalmente localizada a +139pb desde el TSS.

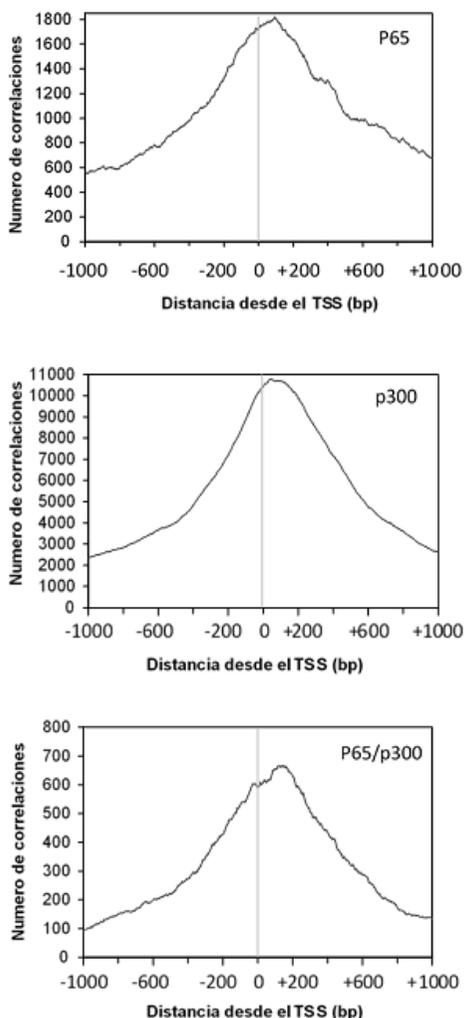


Figura 19: Distribución y localización de los sitios de unión de p65, p300 y p65/p300. Se representa el número de correlaciones entre la región a la que se une cada factor y la distancia respecto al TSS (0). El pico indica la región a la que se une con mayor frecuencia cada factor para la totalidad de los genes encontrados.

Por lo tanto, nuestros resultados podrían sugerir que a pesar de que p65 pueda unirse a diferentes sitios a lo largo de los promotores génicos o *enhancers*, muy probablemente la accesibilidad de p300 esté restringida a algunos complejos p65 localizados cerca del TSS de los genes. Esta circunstancia podría ser la responsable de la selección específica del inicio de la transcripción de una selección de genes.

1.5.3. Densidad de elementos de unión de NF- κ B en los promotores.

NF- κ B podría activar la transcripción génica de una forma sinérgica por unión cooperativa a varios sitios V κ NF- κ B (secuencia con matriz de la familia de NF- κ B de vertebrados) dispuestos en tandem en los promotores génicos. Para determinar si la frecuencia de sitios de unión de NF- κ B estaba implicada en la selección específica de los genes-p65/p300 en la glándula mamaria tras 48h de involución, mediante el programa Gene2Promoter se buscaron posibles motivos de unión para NF- κ B. La frecuencia de los sitios de unión de NF- κ B se calculó como el porcentaje de secuencias con una predicción de sitios de unión V κ NF- κ B localizados entre -500pb *upstream* del primer TSS y 100pb *downstream* del último TSS. Se analizaron los genes que unían p65-sólo o p65/p300 en el grupo de genes que previamente habían sido identificados como parte del proceso pro-inflamatorio.

Los genes pro-inflamatorios pertenecientes tanto al grupo p65-sólo como al p65/p300 tenían sitios V\$NF-κB predichos en al menos un 86% de las secuencias analizadas (**Tabla III**). Además, especialmente en el grupo de genes p65/p300, la mayoría de los genes poseían un único sitio de unión V\$NF-κB en esta región. Por lo tanto, no parece ser que la cooperación de varios sitios V\$NF-κB, así como la disposición en tándem de estos, sea el motivo por el cual algunos de los genes diana de p65 recluten p300 activando la transcripción de dichos genes.

Tabla III

	Predicción del numero de sitios de unión de NF-κB						
	p-valor	1		2		3	
		% Seq	Ratio	% Seq	Ratio	% Seq	Ratio
Genes diana de p65/p30	1.29E-20	54,5	7.1E-02	19,7	4.5E-02	13,6	2.2E-02
Genes diana de P65 solo	2.4E-90	46,5	2.0E-02	30,6	1.29E-20	13,9	8.2E-02
	p-valor	4		5		>5	
		% Seq	Ratio	% Seq	Ratio	% Seq	Ratio
Genes diana de p65/p30	1.29E-20	4,5	1.1E-02	6,06	1.5E-02	1,5	3.7E-02
Genes diana de P65 solo	2.4E-90	4,3	3.1E-02	3,32	2.4E-02	1,3	9.4E-02

Tabla III. Predicción de la frecuencia de sitios de unión para V\$NF-κB en los promotores de genes relacionados con la inflamación. Mediante el programa Gene2Promoter se analizó la presencia de sitios V\$NF-κB en genes relacionados con el proceso inflamatorio que unen solamente p65 o p65/p300. La frecuencia se expresa como el porcentaje de secuencias que contienen 1, 2 o 3 sitios de unión predichos para V\$NF-κB en el promotor proximal. El ratio representa la relación entre genes relacionados con la inflamación y la totalidad de genes con los sitios de unión de V\$NF-κB.

I.5.4. Elementos de unión de factores de transcripción adicionales comunes a los promotores.

Tal como se ha mencionado, la actividad transcripcional de NF- κ B podría depender también de su interacción con factores de transcripción pertenecientes a otras matrices de familia. Consecuentemente, de esta interacción podría resultar la activación sinérgica de un gen, o por el contrario, tener un efecto antagónico e inhibirse la expresión de dicho gen. Mediante el programa Gene2Promoter, se buscaron posibles sitios de unión de otros factores transcripcionales, comunes en al menos el 86% de las secuencias de los grupos p65-sólo o p65/p300.

Encontramos múltiples sitios de unión para V\$ETSF y V\$KLFS, ya sea en los promotores génicos enriquecidos en p65-solo o en p65/p300 (**Tabla IV**). Curiosamente, cuando se restringió el mismo análisis a los genes donde se predijo un sitio de unión V\$NF- κ B, se observó que mientras que el 85 % de las secuencias de promotores enriquecidos en p65/p300 presentaban un motivo V\$SP1F, este estaba ausente de las secuencias del grupo p65-solo. En este sentido es importante destacar que muchos de los sitios GC de los promotores génicos, conocidos como sitios de unión de Sp1, no necesariamente tienen por qué unir Sp1. Los sitios CG pueden unir factores de la familia KLF. Aunque fuera del objeto de estudio de este trabajo, en el futuro sería importante investigar si la relación entre KLFS/SP1F y NF- κ B está implicada en la modulación de la expresión de un grupo de genes concreto en la glándula mamaria a 48h de involución.

Tabla IV

Genes diana de p65		Genes diana para p65/p300	
Sitio de unión	p-valor	Sitio de unión	p-valor
V\$KLFS	5.4E-6	V\$ETSF	0.004
V\$RXRF	2.48E-5	V\$KLFS	0.013
V\$HAND	0.016		
V\$ETSF	0.05		
Genes diana de p65. En los cuales se ha predicho un sitio de unión para NF-κB		Genes diana de p65/p300. En los cuales se ha predicho un sitio de unión para NF-κB	
Sitio de unión	p-valor	Sitio de unión	p-valor
V\$KLFS	2.48E-5	V\$SP1F	1.67E-5
V\$RXRF	2.11E-4	V\$KLFS	8.61E-4
V\$ETSF	0.019	V\$ETSF	0,06
V\$HAND	0.01	V\$HAND	0,22

Tabla IV. Predicción de posibles sitios de unión para diferentes factores de transcripción, en al menos el 86% de las secuencias. Se utilizó el programa Gene2Promoter para buscar sitios de unión de factores transcripcionales dentro de 500 pb upstream del primer TSS y 100 pb downstream del último TSS. Se analizaron los genes que unen solamente p65 o p65/p300, relacionados con el proceso inflamatorio. Posteriormente se realizó un análisis más restrictivo con las secuencias en las que se predijo un sitio de unión para NF-κB. (<http://www.uv.es/eruizy/>)

I.6 Relación entre el *input* y el *output* primario: Análisis de la unión de p65/p300 a los promotores génicos y correlación con la expresión génica.

El eje central de las redes transcripcionales está constituido por factores de transcripción y elementos reguladores en *cis* en los genes diana de dichos factores. Los enlaces funcionales en estas redes vendrán determinados por el *output* primario o serie de

cambios en la expresión de genes con una función reguladora sobre un determinado proceso biológico. Con objeto de validar y profundizar en el *output* primario de NF- κ B en la glándula mamaria en involución, se seleccionaron un grupo de 22 genes derivados de los estudios de ChIP/chip y se analizó la presencia de p65/p300 en el promotor de estos genes mediante CHIP assay en muestras de glándula mamaria en el pico de la lactancia (control) y de 48 horas de involución. Como se muestra en la **figura 20**, p65 y p300 estaban ausentes de todos los promotores de los genes analizados en glándula mamaria control. Sin embargo, la presencia de estos factores se detectó en todos los promotores de los genes seleccionados a las 48 horas tras el destete. En todos los casos, se observó amplificación en los *inputs* y no en los controles negativos (IgG). Por lo tanto, nuestro análisis de validación confirma la especificidad de los datos obtenidos en los experimentos de ChIP/chip.

A continuación, se analizó el impacto final de NF- κ B sobre la posible regulación transcripcional de los genes a los que se unía. Mediante qPCR se analizaron los niveles estacionarios de mRNA de los 22 genes seleccionados en muestras control y tras 48h de destete. Como se muestra en la **figura 21a** todos los genes analizados tenían aumentados sus niveles de mRNA a las 48 horas de destete, en comparación con muestras de glándula mamaria control.

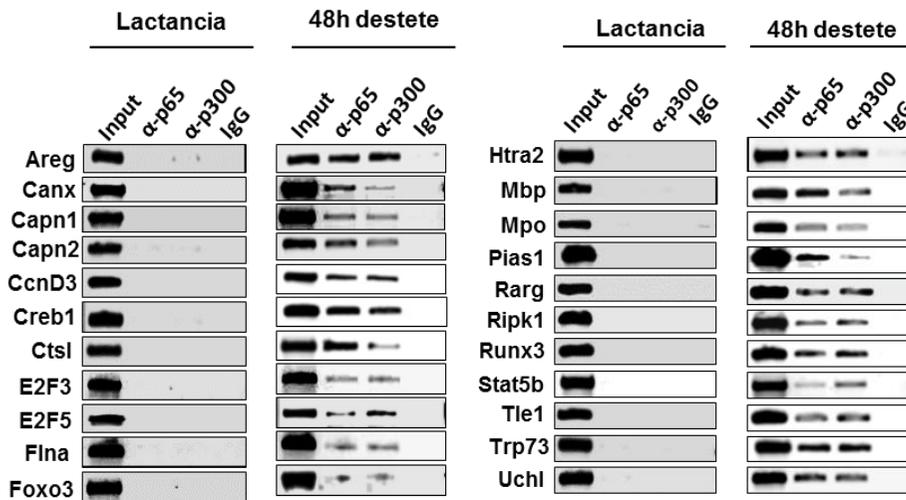


Figura 20. Validación del ChIP/chip de p65/p300. Verificación de la unión de p65 y P300 en una selección de promotores mediante ChIP assay. La cromatina de glándula mamaria control (lactancia) tras 48 horas de destete se inmunoprecipitó con anticuerpos contra p65, p300 o IgG de suero normal. Los ChIPs se analizaron por PCR semicuantitativa con primers específicos para la región promotora de los genes seleccionados. Se muestra un experimento representativo ($n = 3$).

Todos estos datos sugieren que efectivamente los genes que unen p65/p300 representan, dentro de todo el conjunto de genes diana de NF- κ B, una selección de genes transcripcionalmente regulados por NF- κ B. Sin embargo, la abundancia de mRNA puede ser debida, tanto al aumento de la tasa de transcripción génica como a un aumento de la estabilidad del mRNA. La presencia de Pol II en la región codificante de los genes es indicativo de la transcripción del gen en tiempo real (Sandoval et al. 2004). Por este motivo, se analizó la presencia de Pol II en las regiones codificantes de una selección de estos genes, tanto en muestras de glándula mamaria control, como en muestras de 48 horas de involución.

Como se muestra en la **figura 21b**, la Pol II se une a las regiones codificantes de todos los genes analizados a las 48h de involución. Estos resultados sugieren que el aumento de los niveles de mRNA en la glándula mamaria tras el destete está causado principalmente por un aumento de la transcripción.

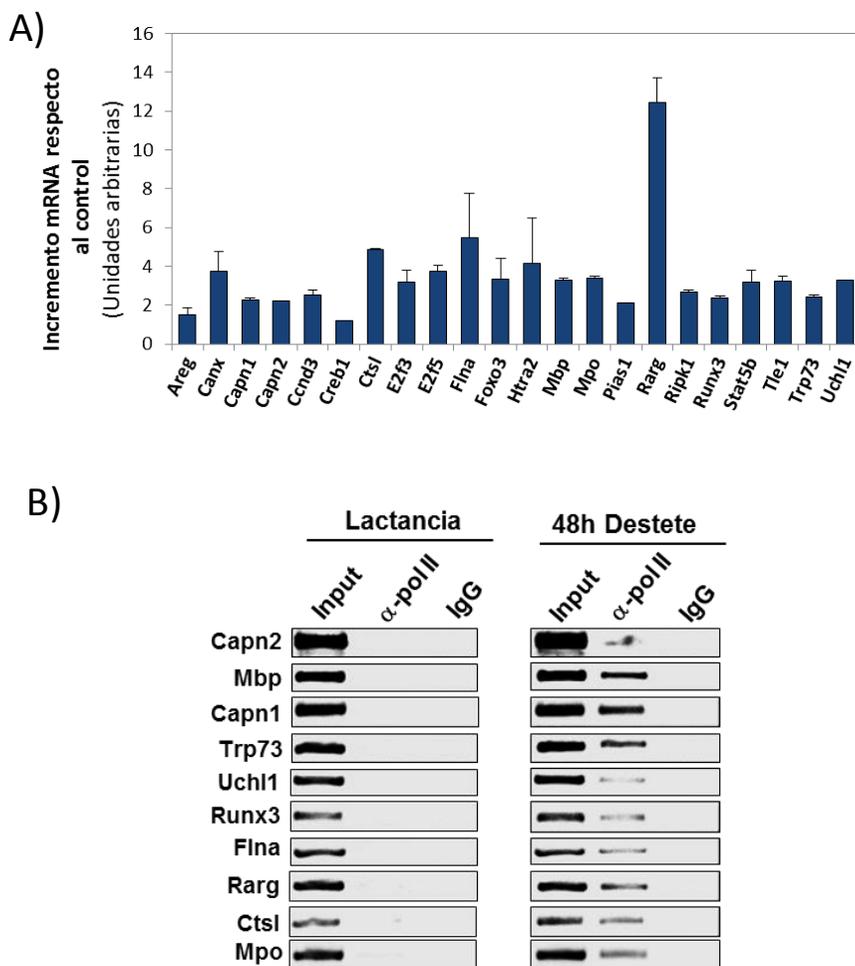


Figura 21. Expresión y transcripción a tiempo real de genes diana de p65/p300. **A)** Niveles de expresión mediante RT-qPCR de genes diana de p65/p300. Incremento relativo respecto al control (lactancia). Los resultados representan el promedio \pm SEM ($n = 4$). P -valor < 0.05 . **B)** Pol II-ChIP de una selección de genes diana de p65/p300 utilizando anticuerpos que reconocen Pol II o IgG de suero normal. Los ChIPs se analizaron por PCR semicuantitativa con primers específicos para las regiones codificante de los genes seleccionados. Se muestra un experimento representativo ($n = 3$).

II. Enlace funcional entre NF- κ B y sus genes diana: Implicación de las calpaínas durante la involución de la glándula mamaria.

Nuestros resultados derivados de los experimentos de ChIP/chip sugieren que el factor transcripcional NF- κ B está relacionado principalmente con funciones proinflamatorias y proapoptóticas durante la involución de la glándula mamaria (**Figura 17**). Tal y como se indicaba en el apartado de introducción de esta tesis, los enlaces funcionales que componen las redes transcripcionales vendrán determinados por la relación entre los *outputs* primarios o genes con función reguladora y los *outputs* secundarios o dianas de dichos genes reguladores, que se manifestarán como la serie de cambios que caracterizan un proceso biológico. Será clave, por tanto, estudiar en profundidad dicho enlace funcional que nos conducirá a una mayor comprensión de las complejas redes transcripcionales desencadenadas durante la involución de la mama.

Anteriormente observamos que, de entre todo el grupo de genes a los que se une p65/p300, este factor se unía a los promotores de los genes que codifican las calpaínas 1 y 2 (**Figura 20**). Las calpaínas son unas cisteín-proteasas dependientes de Ca^{2+} , que están implicadas en varias funciones fisiológicas como la migración, la proliferación celular, el control del ciclo celular y la apoptosis; así como en diferentes patológicas: diversos tipos de cáncer, diabetes tipo 2, distrofias musculares y enfermedades neurodegenerativas (Nemova et al. 2010).

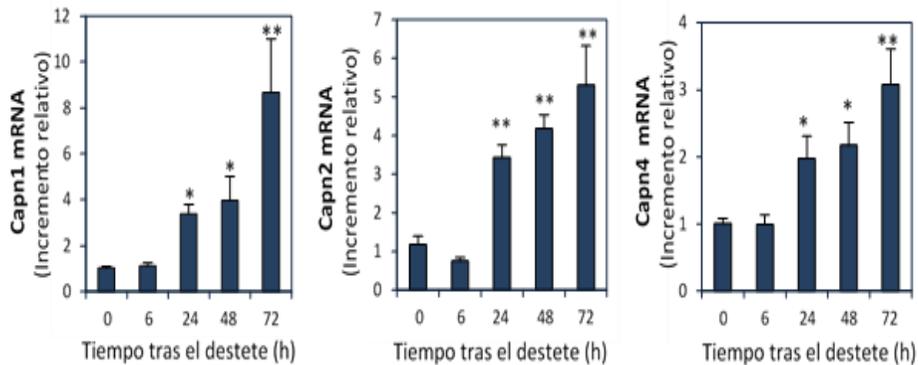
Dentro de la familia de las calpaínas, las más abundantes y mejor caracterizadas son la calpaína 1 (Capn1) y la calpaína 2 (Capn2) (μ -calpaína y m-calpaína respectivamente). El término de μ -/m-calpaína hace referencia a la concentración de Ca^{2+} requerida para su activación *in vitro* (μM o mM respectivamente) (Dutt et al. 2002; Dargelos et al. 2008). De hecho, se ha descrito que un incremento de los niveles de Ca^{2+} provoca la autoproteólisis de unos pocos aminoácidos de los dominios NH_2 -terminales de ambas calpaínas. Estas proteasas existen como heterodímeros, cada una con una subunidad catalítica distinta codificada por el gen *Capn1* y *Capn2* respectivamente; y una subunidad reguladora, común a ambas, codificada por el gen *Capn4* (Beveris et al. 2008).

II.1 Análisis de la expresión de los genes que codifican las calpaínas 1 y 2 a lo largo de la involución.

Mediante qPCR se determinaron los niveles de mRNA de Capn1 y Capn2 a diferentes tiempos de destete (**Figura 22a**), observándose un aumento progresivo de su expresión que alcanzó los niveles más altos a las 72 horas de involución. También se encontró un incremento en la expresión de Calpaína 4, el gen que codifica la subunidad reguladora de Capn 1 y 2 (**Figura 22a**). Además se pudo observar, mediante *western blot*, un aumento de los niveles de proteína durante la involución, tanto en Capn1 como en Capn2 (**Figura 22b**). Es de destacar que para Capn1, además de la banda de 80 kDa esperada, aparecía una banda de menor peso

molecular, debido a la pérdida de algunos aminoácidos del extremo amino terminal de esta calpaína.

A)



B)

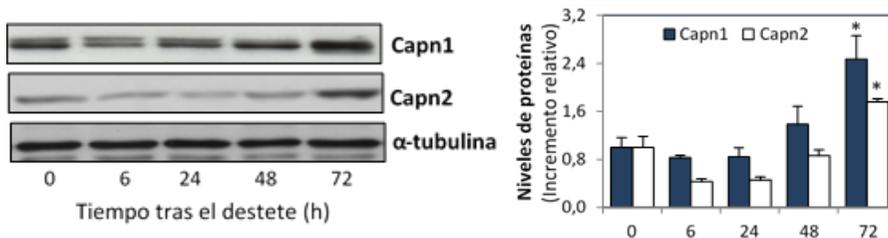


Figura 22. Niveles de expresión de las calpaínas durante la involución de la glándula mamaria. Análisis de expresión de calpaínas en glándula mamaria a diferentes tiempos tras el destete (0, 6, 24, 48 y 72 horas. **A)** qPCR de la Capn-1, -2 y -4. Los valores se normalizaron frente los niveles del 18S. **B)** Niveles de Capn-1 y -2 por western blot (izquierda). Los niveles de proteína se cuantificaron y se normalizaron frente a los niveles de α -tubulina (derecha). Los resultados se muestran como incremento relativo respecto al control y representan la media \pm SEM ($n = 3$). Se han comparado los diferentes tiempos de destete respecto a su tiempo 0. *P-valor < 0.05. **P-valor < 0.001.

II.2 Activación de las calpaínas durante la involución.

El hecho de que aumenten los niveles de proteína, no significa necesariamente, que también lo haga su actividad. Por lo tanto, tras observar un aumento de la expresión de las calpaínas durante la involución de la glándula mamaria (**Figura 22**), se evaluó la actividad Capn a diferentes tiempos tras el destete siguiendo varias aproximaciones:

II.2.1 Medida de actividad calpaína endógena *in vitro*.

Se evaluó la escisión del sustrato artificial Suc-LLVY-AMC por calpaínas procedentes de muestras de glándula mamaria a diferentes tiempos tras el destete. Se observó un aumento de la actividad estadísticamente significativo a las 48 horas tras el destete, llegando a una actividad máxima a las 72 horas de involución (**Figura 23**).

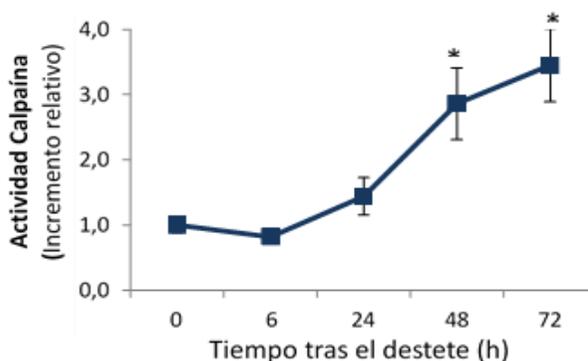


Figura 23. Actividad calpaína durante la involución de la glándula mamaria. La actividad proteasa de las calpaínas se midió en muestras de glándula mamaria en el pico de la lactancia (0 h) y en ratones destetados a diferentes tiempos (6, 24, 48 y 72 horas). Los resultados se muestran como incremento relativo respecto al control y representan la media \pm SEM ($n = 3$). T-student vs tiempo 0. *P-valor < 0.05.

II.2.2. Medida de actividad calpaína *in vivo*.

Como se ha comentado anteriormente, en presencia de Ca^{2+} , se produce la autoproteólisis del dominio NH_2 -terminal de las Capn 1 y 2, generando una forma escindida activa (Baki et al. 1996). Se analizó la activación de las calpaínas, mediante *Western blot* con anticuerpos contra el epítipo NH_2 -terminal de estas. En consonancia con los resultados anteriores, como se muestra en la **Figura 24**, la banda de 80 kDa, correspondiente a la Capn inactiva, disminuía a las 24-48 horas tras el destete hasta niveles casi indetectables, tanto para Capn1 como para la Capn2, lo que indica que se produce una posible autólisis.

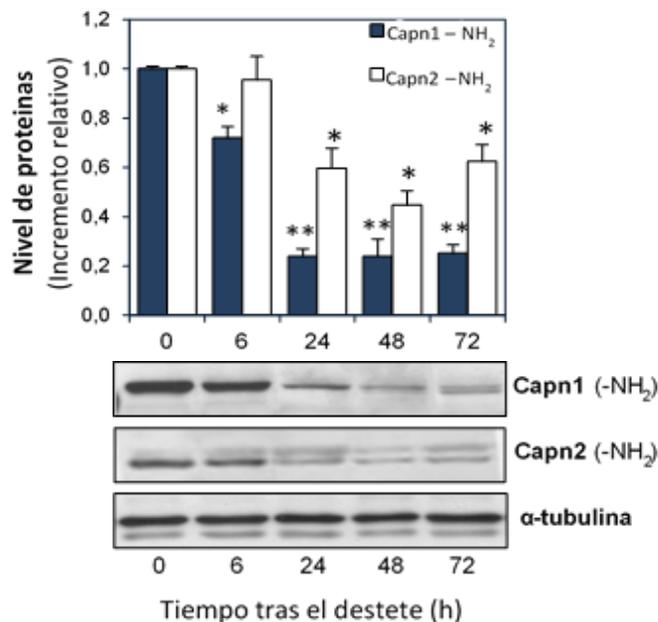


Figura 24. Activación de calpaínas a lo largo de la involución de la glándula mamaria. *Western blot* del extremo amino-terminal de la Capn-1 y -2 a distintos tiempos tras el destete. La intensidad de las bandas se cuantificó y se normalizó frente a α -tubulina. Los resultados se muestran como incremento relativo respecto al control y representan la media \pm SEM ($n = 3$). T-student vs tiempo 0. *P-valor < 0.05. ** P-valor < 0.001.

II.3 Localización celular de las calpaínas en la glándula mamaria durante la involución.

Puesto que las calpaínas requieren unas concentraciones muy elevadas de calcio para su activación, se ha descrito que estas tienden a localizarse en regiones donde puede existir un flujo intenso de calcio y/o en zonas donde se puedan alcanzar estas concentraciones tan elevadas de Ca^{2+} (Hood et al. 2006). Para determinar el lugar en el que tiene lugar la activación de las calpaínas que hemos observado, se realizó una inmunofluorescencia con anticuerpos anti-Capn1 o anti-Capn2 en muestras de glándula mamaria en el pico de lactancia.

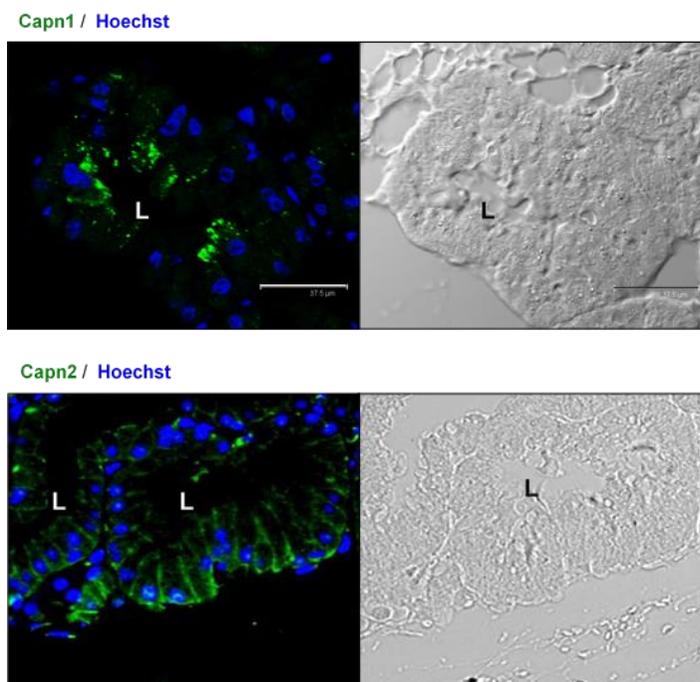


Figura 25. Análisis inmunohistoquímico de Capn1 y Capn2 en ratones en el pico de la lactancia. Capn1 y Capn2 (Verde), núcleos en azul (Hoeschst-33342). Se muestran simultáneamente las imágenes de campo claro. Escala, 37,5 micras. L: Lumen.

La Capn1 se localiza principalmente a la cara apical de las células epiteliales durante la lactancia (**Figura 25**), donde se localiza el principal transportador de calcio PMCA2 (VanHouten et al. 2010) y, por lo tanto, donde el calcio se podría acumular inicialmente durante el destete. Sin embargo, la Capn2 presenta una distribución periférica, cerca de la membrana plasmática (**Figura 25**).

En consonancia con la localización de la Capn1 en posibles lugares de acumulación de Ca^{2+} , se observó una disminución de los niveles de expresión de PMCA2 tras las 24 horas de destete (**Figura 26**).

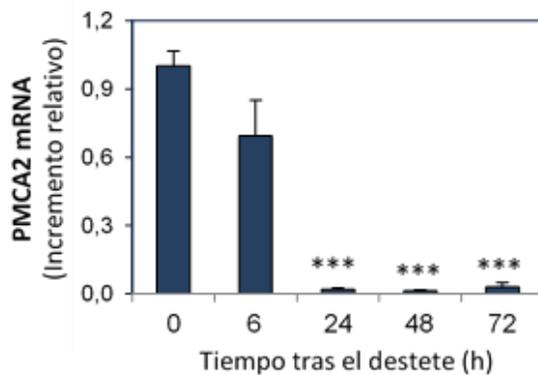


Figura 26. Niveles de expresión de la bomba de calcio PMCA. qPCR, de PMCA2 en ratones en el pico de lactancia (0h) y a diferentes tiempos tras del destete (6, 24, 48 y 72 horas). Los resultados se muestran como incremento relativo respecto al control y representan la media \pm SEM ($n = 4$). T-student respecto al tiempo 0. *** P -valor < 0.0001 .

Además, como se puede observar en la **figura 27**, los niveles de calcio intracelular empiezan a aumentar a las 6 horas tras el destete forzado, siendo estadísticamente significativo a las 24 horas, punto en que las calpaínas empiezan a estar activas (**Figura 23 y 24**).

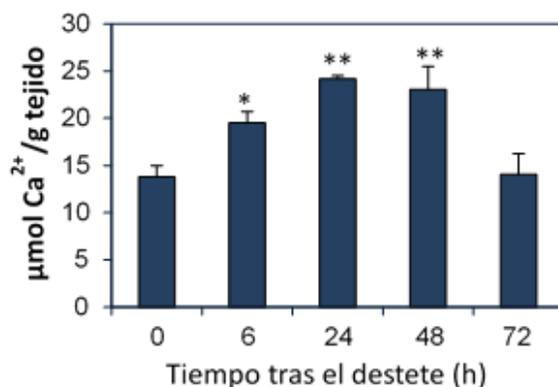


Figura 27. Contenido de calcio en la glándula mamaria de ratones durante la involución. $\mu\text{moles de Ca}^{2+}$ en muestras de glándula mamaria en el pico de la lactancia y a 6, 24, 48 y 72h tras el destete forzado. Los resultados se muestran como la media \pm SEM ($n = 4$). T.student vs tiempo 0. *P-valor < 0.05. ** P-valor < 0.001.

Para determinar si la activación de la Capn1 que hemos observado, tiene lugar en células epiteliales de la glándula mamaria, se realizó una inmunofluorescencia con anticuerpos anti-Capn1-NH₂. Como se puede observar en la **figura 28**, la señal fluorescente (verde) del dominio NH₂ de la Capn1 disminuye drásticamente a las 24, 48 y 72 horas tras el destete. Estos resultados confirman que la actividad calpaína empieza a aumentar a las 24 horas de destete y sugieren la localización principalmente epitelial de esta proteasa.

Todos estos resultados van en concordancia con estudios anteriores, en los que la pérdida de PMCA2 producía un aumento de los niveles de calcio intracelulares y las células epiteliales de la glándula mamaria quedaban sensibilizadas a la apoptosis (VanHouten et al. 2010). En nuestro laboratorio hemos descrito el

papel apoptótico que desempeña la calpaína 1 en la mitocondria, en los lisosomas y en el núcleo, durante la involución de la glándula mamaria, aumentando la permeabilidad de estos compartimentos subcelulares, y por consiguiente, favoreciendo la apoptosis (Arnandis et al. 2012; Arnandis et al. 2014).

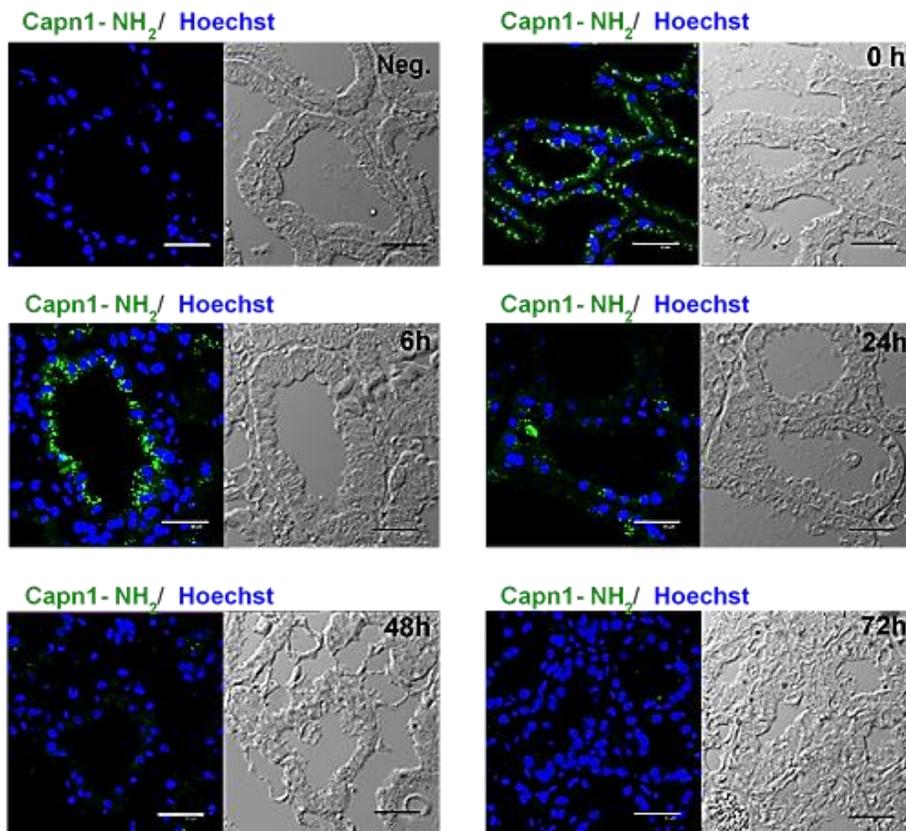


Figura 28. Localización de la calpaína activa en la glándula mamaria tras el destete. Inmunofluorescencia del extremo amino-terminal de la calpaína 1 (verde) a diferentes tiempos tras el destete (0, 6, 24, 48 y 72 horas). Los núcleos celulares se muestran en azul (Hoeschst-33342). Se muestran simultáneamente las imágenes de campo claro con el fin de visualizar la localización exacta de la señal fluorescente en la estructura de la glándula mamaria. Escala: 30 μ m.

II.4 Papel de la calpaína-2 en la desestabilización de las uniones intercelulares del epitelio luminal durante el destete.

Puesto que parece que la Capn2 presente una localización baso-lateral en las células epiteliales (**Figura 25**), y debido a que ha sido descrito un posible papel de las calpaínas en la desestabilización de las uniones entre células (Carragher & Frame, 2002; Franco & Huttenlocher, 2005), nos planteamos la posibilidad de que la Capn2 pudiese tener un papel en la ruptura de estas uniones y, por lo tanto, en el desprendimiento de las células epiteliales al lumen de los acinis durante la involución de la glándula mamaria tras el destete.

II.4.1 Niveles de proteínas de adhesión celular durante el destete.

En los últimos años se han descrito varias proteínas diana de las calpaínas relacionadas con la adhesión y la migración celular. En este sentido, se ha descrito que las calpaínas participan en la desestabilización del complejo de adhesión focal mediante la proteólisis de la proteína Talina 1 (Franco et al. 2004). Estas proteasas también se han visto implicadas en la proteólisis parcial de diferentes proteínas de las uniones adherentes intercelulares. Algunas de estas proteínas son E-Caderina (E-Cdh), Catenina p120 (p120) y la β -Catenina (β -Cat) (Rios-Doria et al. 2003; Ohno et al. 2006; Benetti et al. 2005). Además, la desestabilización de estos complejos por parte de las calpaínas favorece la migración celular (Glading et al. 2004; Chan et al. 2010). Con el fin de comprobar si

existe una reducción de los niveles de algunas de estas proteínas tras el destete, nos propusimos, en primer lugar, analizar los niveles de dichas proteínas a lo largo de la involución mediante *western blot* (Figura 29).

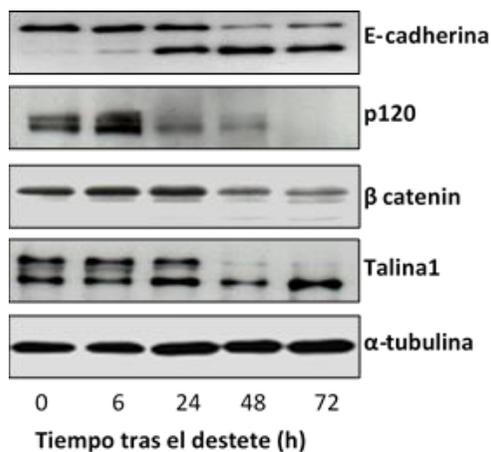


Figura 29. Niveles de proteínas de adhesión celular durante la involución de la glándula mamaria. Niveles de expresión E-Cadherina, p120, Talina1 y β-Catenina mediante WB en extractos totales de proteínas procedentes de glándula mamaria en el pico de la lactancia (0), y a diferentes tiempos de destete (6, 24, 48 y 72h). Los niveles de β-tubulina se utilizaron como control del cargado equitativo de las muestras. Se muestra un experimento representativo (n=3).

En general, se observó que los niveles de Talina 1, p120 y E-Cdh empezaban a disminuir a partir de las 24 horas tras el destete y continuaron disminuyendo progresivamente con la involución. En el caso de la β-Cat, se empezó a ver dicha reducción a partir de las 48h, manteniéndose hasta las 72h de destete. Además, se pudo apreciar un aumento progresivo de fragmentos de Talina 1, β-Cat⁷⁵ (fragmento de β-Cat de 75 kDa) y E-Cdh⁹⁵ (fragmento de E-Cdh de 95 kDa), lo que sugiere que, durante el destete, estas proteínas no reducen su expresión, sino que están siendo proteolizadas.

II.4.2. Ensayos *in vitro* con calpaínas recombinantes.

Con el objetivo de comprobar si las calpaínas están implicadas en la escisión de las diferentes proteínas que forman parte de los complejos de adhesión focal y de las uniones adherentes intercelulares, que disminuyen durante el destete, se realizaron ensayos de proteólisis *in vitro* con calpaínas recombinantes. Para ello, se incubaron diferentes muestras de extracto proteico total de glándula mamaria de ratones en el pico máximo de lactancia, con concentraciones crecientes de Capn1 (**Figura 30a**), o Capn2 recombinante (**Figura 30b**), en presencia o ausencia de calcio.

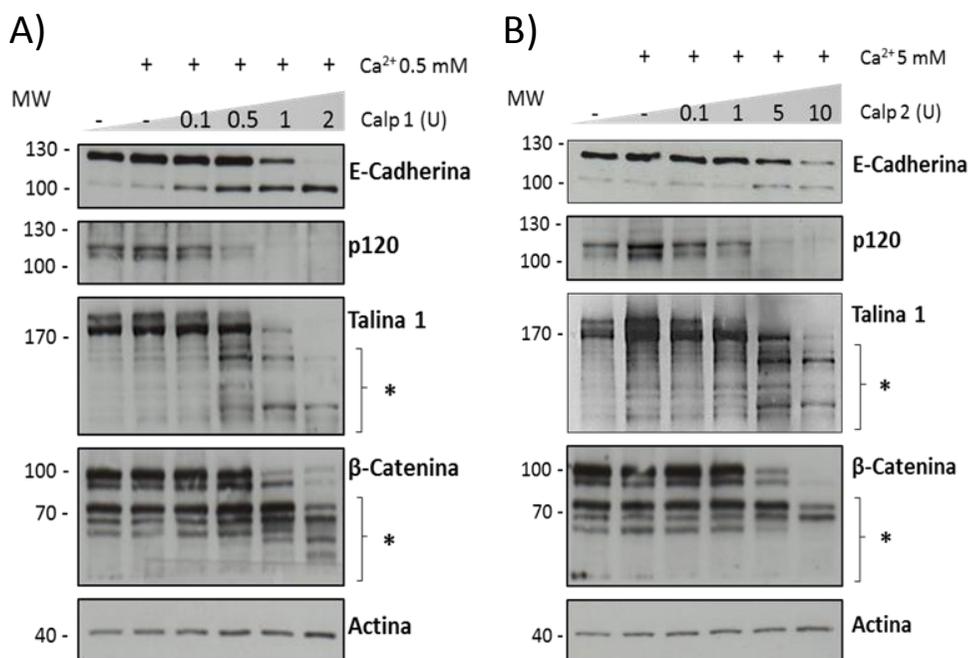


Figura 30. Papel de las calpaínas sobre la fragmentación de complejos de adhesión celular *in vitro*. Extractos proteicos totales de ratones en el pico de la lactancia fueron incubados con concentraciones crecientes de **A)** calpaína 1 o **B)** calpaína 2 en presencia de calcio. La fragmentación de las diferentes proteínas de adhesión se analizaron mediante WB. Los asteriscos (*) hacen referencia a fragmentos generados por la degradación de Talina 1 y β-catenina.

Los resultados de los experimentos de incubaciones con concentraciones crecientes de calpaínas indican que ambas proteasas son capaces de romper *in vitro* los complejos de anclaje intercelular, aumentando la aparición de fragmentos de Talina 1, β -Cat y E-Cdh. En ausencia de calpaína, no observamos degradación de dichas proteínas. Estos resultados coinciden con lo observado durante el destete.

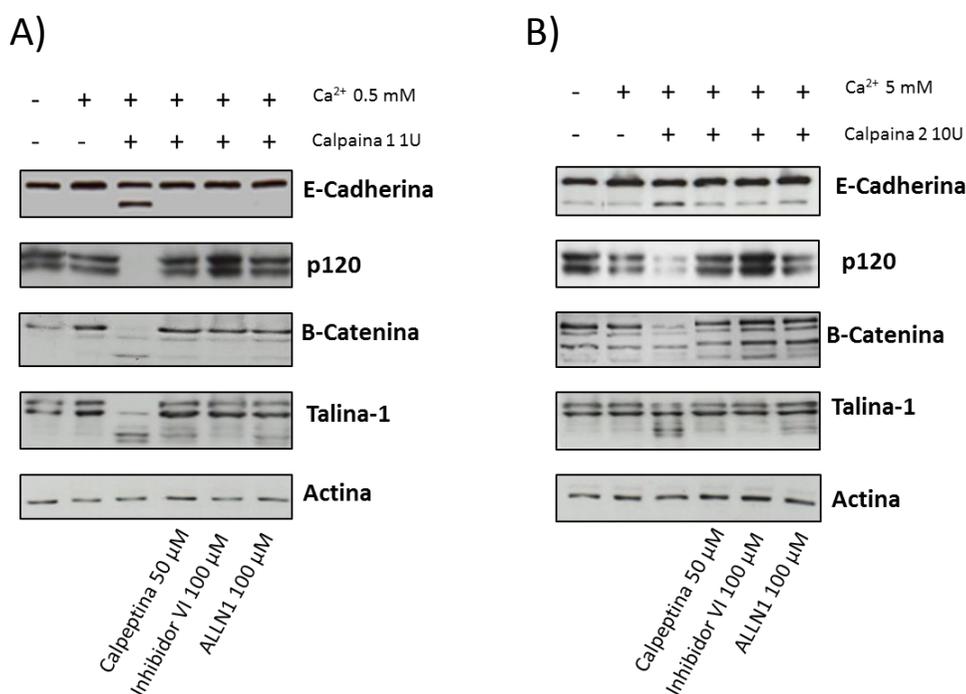


Figura 31. Medida de especificidad de la fragmentación de complejos de adhesión celular mediada por calpaínas. Extractos totales de proteínas de glándula mamaria en el pico de la lactancia se incubaron con Ca²⁺ y **A)** capn1 o **B)** capn2 (1 y 10 U respectivamente) en presencia o ausencia de diferentes inhibidores (calpeptina, inhibidor específico de calpaína, e inhibidor VI y ALLN1, inhibidores genéricos de calpaínas y catepsinas). Posteriormente se realizó un WB contra las diferentes proteínas de adhesión.

Además, para comprobar que estas proteínas estaban siendo degradadas de forma específica por las calpaínas, se incubaron los extractos de proteínas de glándula mamaria proveniente de ratones en el pico de la lactancia, en presencia o ausencia de diferentes inhibidores de calpaínas: calpeptina (inhibidor sintético específico de calpaínas), inhibidor VI y ALLN (inhibidores generales de calpaínas y catepsinas) (**Figura 31**). Nuevamente, observamos una degradación proteolítica de las proteínas de adhesión en presencia de calpaína 1 y 2. Además, los fragmentos E-Cdh⁹⁵, β -Cat⁷⁵ y Talina¹³⁰ generados por calpaína dejan de verse cuando añadimos los diferentes inhibidores de calpaínas, observándose nuevamente el tamaño completo de las diferentes proteínas de adhesión intercelular. Por lo tanto, ambas calpaínas fragmentan de forma específica las diferentes proteínas de adhesión *in vitro*.

II.4.3. Identificación de la calpaína responsable de la escisión de las proteínas de adhesión celular.

Para comprobar si la escisión de las proteínas de unión intercelulares estaban causada por la calpaína 1 o por la calpaína 2, se transfectaron células NMUMG (células epiteliales de glándula mamaria de ratón) con siRNA para la calpaína 1 o para la calpaína 2.

La transfección de las células con siRNA de la Capn2 mostró una inhibición de esta calpaína de aproximadamente el 80% de la Capn2 (**Figura 32**). Sin embargo no se observó inhibición de la calpaína 1, demostrando la especificidad de la transfección. Cuando

se comparan los niveles de proteína de las células transfectadas con las células control (células transfectadas con siRNA no relacionado), se observó una mayor cantidad de p120, cuando la expresión de Capn2 se encontraba inhibida.

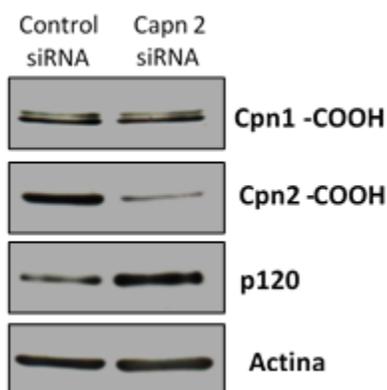


Figura 32. Papel de Capn2 sobre la proteólisis de la catenina p120. Las células NMUMG se transfectaron con siRNA no relacionado (control) o con siRNA contra Capn2. Los niveles de expresión de Capn1, 2 y p120 se analizaron mediante WB. La igualdad de carga fue confirmada usando un anticuerpo frente β -actina.

Al igual que en el caso anterior, se transfectaron las células NMUMG con siRNA de calpaína 1, observándose una inhibición de aproximadamente el 80% de la Capn1. Sin embargo, en este caso no se observó un aumento de los niveles de la proteína p120 (**Figura 33**). Estos resultados, junto con la colocalización de la Capn2 en la membrana plasmática de las células epiteliales de la glándula mamaria tras el destete (**Figura 34**) indican que, probablemente, la calpaína responsable de la fragmentación de p120 sea la Capn2 y no la 1.

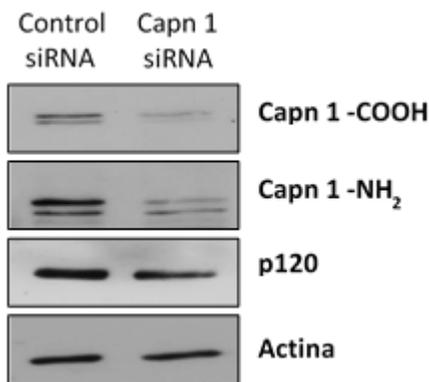


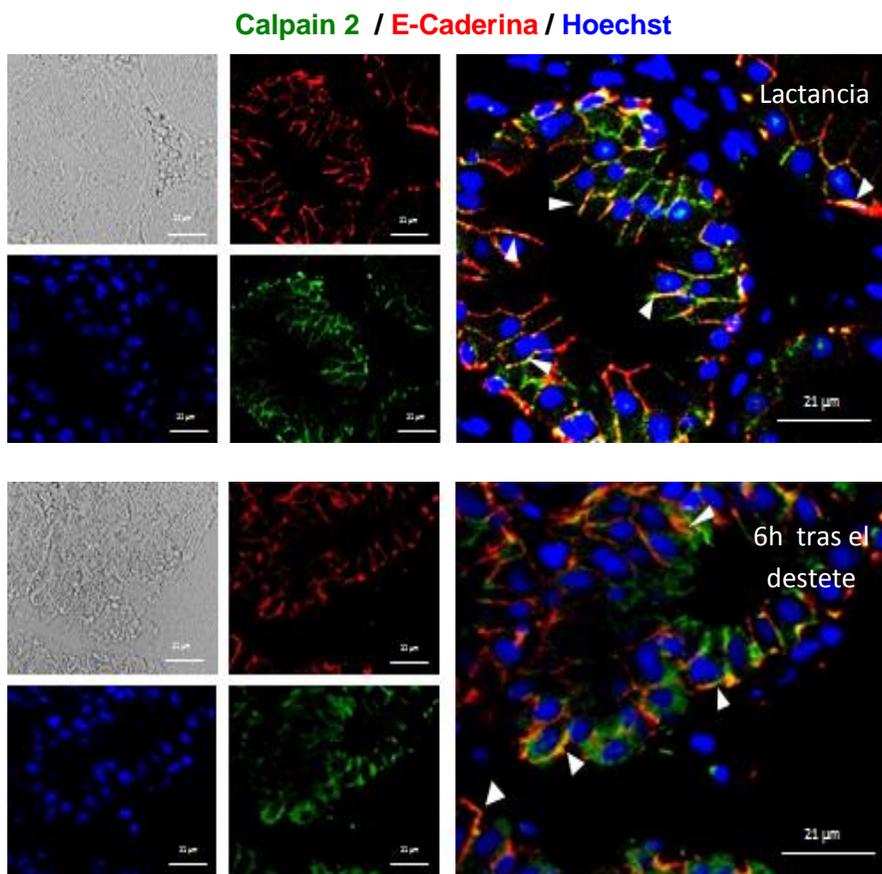
Figura 33. Papel de Capn1 sobre la proteólisis de la catenina p120. Las células NMUMG se transfectaron con siRNA no relacionado (control) o con siRNA contra *Capn1*. Los niveles de expresión de *Capn1* y *p120* se analizaron mediante WB. La igualdad de carga fue confirmada usando un anticuerpo frente β -actina.

II.4.4. Localización subcelular de la Calpaína 2 a lo largo de la involución de la glándula mamaria.

Se ha sugerido que la localización subcelular de las calpaínas está ampliamente regulada y constituye un factor importante en la modulación de sus funciones (Franco & Huttenlocher, 2005). Puesto que se había observado que la calpaína 2 parecía tener una localización periférica, alrededor de las membranas plasmáticas de las células epiteliales, realizamos estudios *in vivo* para comprobar si existe una colocalización entre esta calpaína y los complejos de adhesión celular, concretamente con la proteína E-Cdh. Para ello, se realizó un estudio de inmunofluorescencia en cortes de tejido de glándula mamaria murina a diferentes tiempos tras el destete (**Figura 34**).

Los resultados muestran que, en el pico de lactancia, la Capn2 se sitúa casi completamente en la cara citosólica de la membrana plasmática, colocalizando perfectamente con E-Cdh, confirmando lo

observado en la **figura 25**. No obstante, a medida que transcurre el destete, podemos ver que Capn2 difunde progresivamente hacia el citosol. Concretamente, se observa que la Capn2 comienza a aparecer en el citosol a las 6 horas, llegando a ocupar prácticamente toda la célula (exceptuando el núcleo) a las 72h. Cabe destacar que la Capn2 presenta colocalización con la E-Cdh a lo largo de todo el destete, aunque esta no se encuentre activa hasta las 24 horas de involución (**Figura 23 y 24**), momento en el que se empieza a observar la aparición del fragmento de 95 KDa de la E-Cdh.



Calpain 2 / E-Caderina / Hoechst

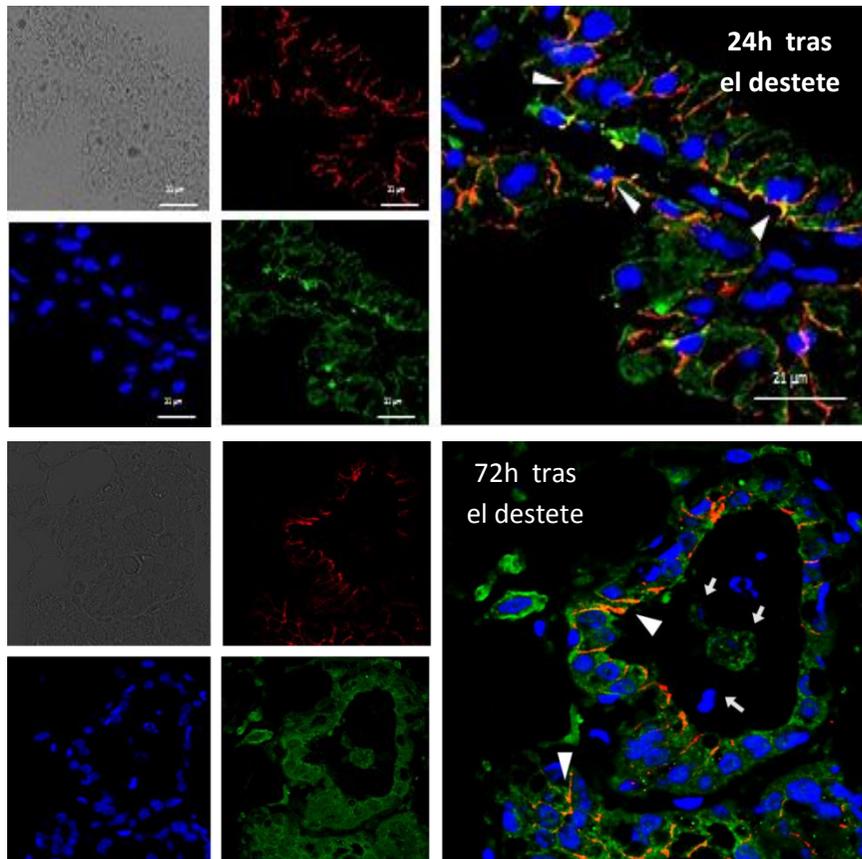


Figura 34. Localización de *Capn2* en la membrana plasmática durante el destete. Secciones de tejido mamario de ratón procedentes de tejido control (11 días de lactancia), 6, 24 y 72h de destete fueron fijados y marcados con anticuerpos contra E-Caderina (rojo) y *Capn2* (verde). Los núcleos fueron teñidos con Hoechst-33342 (azul). La escala para todas las imágenes es de 21 μm . Punta de flecha: Colocalización entre calpaína 2 y E-Cdh. Flecha: Células desprendidas al lumen de los acinis.

III. Id2 como nodo de regulación de redes transcripcionales en el hígado.

Las funciones celulares y la homeostasis tisular dependen de la regulación precisa de múltiples y convergentes vías de señalización que, con frecuencia, comparten uno o varios pasos, dando lugar a respuestas redundantes. Sin embargo, existen proteínas clave o nodos de regulación que pueden ser determinantes de la especificidad de respuesta frente a un estímulo.

El factor de transcripción c-myc, un oncogen cuya expresión está modulada por E2F4, es una de esas proteínas clave que participan en la modulación de una gran variedad de procesos biológicos. El promotor de c-myc contiene un sitio de unión para E2F. E2F es esencial para la transcripción de c-myc, dado que funciona como plataforma para reclutar proteínas de la familia de pRB y complejos HDAC. En el promotor de c-myc existe una secuencia que solapa con el sitio de unión de E2F y que resulta esencial para la remodelación nucleosomal y para mantener una estructura "abierta" de la cromatina (Albert et al. 2001; Chen et al. 2002). En estudios previos de nuestro laboratorio se demostró, en modelos experimentales de cirrosis o de regeneración hepática por PHx, el importante papel que juega Id2 en la modulación de la expresión de c-myc. En hepatocitos quiescentes, Id2 permanece unido, junto con E2F4, al complejo represor Sin3A/HDAC y la expresión de cmyc se mantiene baja. Inmediatamente después de la PHx, durante la fase de transición G0-G1, se desmonta este complejo y se inicia la transcripción de c-myc (Rodríguez et al.

2006). Sorprendentemente, el inicio de la transcripción de c-myc se ve compensado por un bloqueo concomitante de la elongación (Morello et al. 1990).

El hecho insólito de que en la regeneración hepática se estimulen tanto el pausado como el inicio de la transcripción, llevó a sugerir que el inicio de la transcripción de c-myc en este proceso, podría estar dirigido por un componente de respuesta más general: varios genes con secuencias diana comunes podrían estar activados simultáneamente por un mecanismo común, pero sólo los factores adicionales y específicos determinarían el patrón final de expresión génica. Estos datos nos llevaron a cuestionar el posible papel de Id2 como parte de este mecanismo común para la transcripción de los genes modulados por E2F. Se ha propuesto que Id2 forma parte de un mecanismo intrínseco de la célula para controlar o limitar temporalmente procesos que dependen de una cadena secuencial de señales. Estas deberán sintetizarse transitoriamente para la correcta coordinación de la red transcripcional y la resolución del *output* final (Wang et al. 2001).

Id2 es una proteína pleiotrópica, cuya función va a depender del entorno en el que se encuentre. Además, dado que la expresión de un mismo gen se induce en respuesta a muchos tipos de estímulos, y que con frecuencia las mismas señales participan en muchos procesos biológicos, el estudio de la funciones de Id2 y de los mecanismos moleculares que subyacen a sus funciones resulta extremadamente complejo. Por todo ello, abordamos el estudio de Id2 como nodo de regulación transcripcional hepático mediante

experimentos de CHIP/chip con anticuerpos específicos contra Id2 y E2F4 en muestras de hígado de ratón.

III.1 Identificación de genes diana de E2F4/Id2 en hígado de ratón mediante análisis CHIP/chip.

Para analizar si Id2 juega un papel global en la regulación transcripcional o si se limita a los genes diana de E2F4 en hígado de ratón, se realizó una inmunoprecipitación de cromatina con anticuerpos anti-Id2 y anti-E2F4, seguida de un array de promotores de todo el genoma de ratón.

Con el fin de disminuir falsos positivos, se aplicó el mismo análisis restrictivo que se ha descrito para el CHIP/chip de p65 (FDR = 0). Las curvas resultantes de dicho análisis se muestran en la **figura 35**.

En el análisis, de al menos tres experimentos independientes en muestras de hígado de ratón adulto, se identificaron 3875 genes diana para E2F4 y 666 para Id2 (los datos en bruto se pueden encontrar en el CD adjunto y en los recursos *online* 2, 3 y 4 del artículo Ferrer-Vicens et al. 2014).

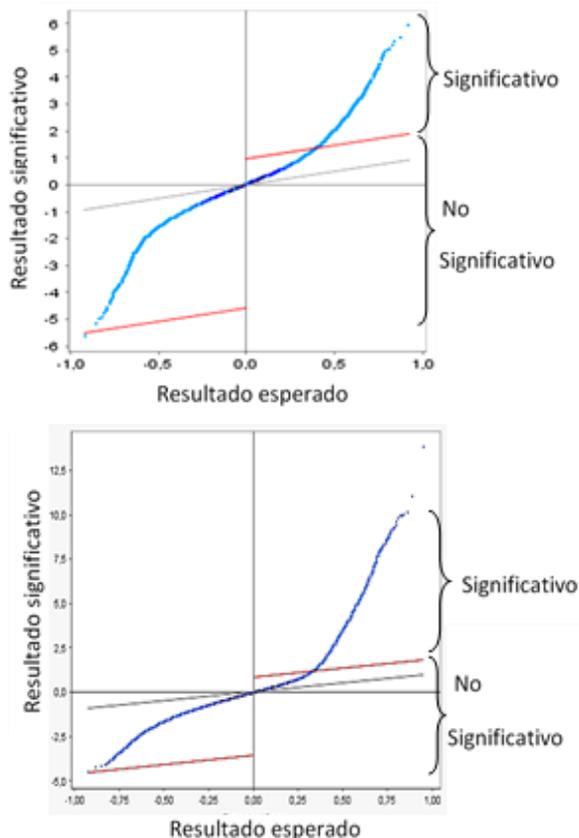


Figura 35. Curva de significación estadística del ChIP/chip de A) Id2 y B) E2F4. Los gráficos muestran los valores observados (= reales,) en el eje de las Y, respecto a los valores esperados (= fondo), en el eje X. Las funciones con valores de desviación $> \Delta$ representan el enriquecimiento de Id2 o E2F4 en el hígado de ratones adultos en comparación con el DNA genómico total.

Como se muestra en la **Figura 36**, un análisis de ambos grupos de genes diana reveló una superposición de 442 genes que unían ambas proteínas, E2F4 e Id2. Estos datos confirman, que a pesar de que la gran mayoría de los genes diana de E2F4 (89%) no unen Id2, existe un importante subconjunto de genes (11%) en los que Id2 podría tener un papel como un regulador transcripcional. Por otro lado, también encontramos que hay un conjunto de genes a los que sólo se une Id2 (33% del total de los genes que unen Id2).



Figura 36: Diagrama de Venn de los genes diana de E2F4, Id2 identificados mediante CHIP/chip. Los genes diana se obtuvieron como resultado de tres experimentos independientes de CHIP/chip para cada anticuerpo en muestras de hígado de ratón adulto. El solapamiento de diagramas indica los genes a los que se unen simultáneamente E2F4 e Id2.

III.2 Cooperación de elementos en los promotores a los que se une E2F4/Id2.

III.2.1 Análisis de la localización genómica de los sitios de unión de E2F4/Id2 a promotores.

Con el fin de determinar posibles diferencias de localización genómica de los factores E2F4, Id2 o E2F4/Id2 se realizó un análisis mediante el programa RegionMiner (Genomatix) que utiliza anotaciones generales y estadísticas para regiones genómicas en todo el genoma de ratón. Este análisis mostró que las regiones de unión, tanto de las formas libres, como del complejo E2F4/Id2, tenían una distribución homogénea sin ninguna diferencia aparente entre los tres grupos, uniéndose preferentemente a los promotores de los diferentes genes (**Figura 37a**).

III.2.2. Distancia de unión de E2F4/Id2 respecto al TSR y TSS.

Sin embargo, un análisis más exhaustivo de la distribución de las regiones que solapaban con los promotores, reveló diferencias importantes entre los grupos. La mayor parte de las regiones incluidas en promotores que unían Id2 con o sin E2F4 (87% Id2-sólo y 90,6% E2F4/Id2) contenían, al menos, una región de inicio de la transcripción (TSR, que se define como una región con más de un sitio de inicio de la transcripción) a una distancia de menos de 40pb) solapada con el primer intrón o con el primer exón. Sin embargo, tan sólo un 35% de las regiones que unen E2F4 presentaban esta característica (**Figura 37b**).

A)

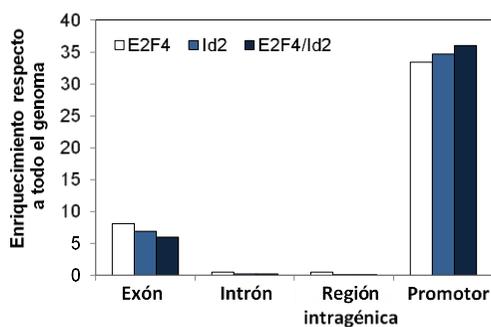
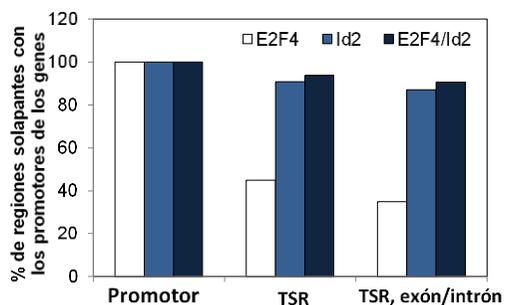


Figura 37: Clasificación de regiones a las que se une Id2 y E2F4 en todo el genoma. Localización del sitio de unión de E2F4 (blanco), Id2 (azul claro) y E2F4/Id2 (azul oscuro).

A) Fracción enriquecida comparada con todo el genoma. **B)** porcentaje de regiones solapantes con los promotores que incluyen un TSR, o un TSR en el que se encuentra incluido el primer exón o intrón.

B)



Para establecer con mayor detalle la posición donde se une E2F4/Id2, se analizó la frecuencia de correlaciones entre las regiones de unión de las distintas proteínas y la distancia al TSR o al TSS. Los tres grupos de regiones diana de E2F4, Id2 y E2F4/Id2, se encontraban centrados en sus respectivos TSRs (**Figura 38a**).

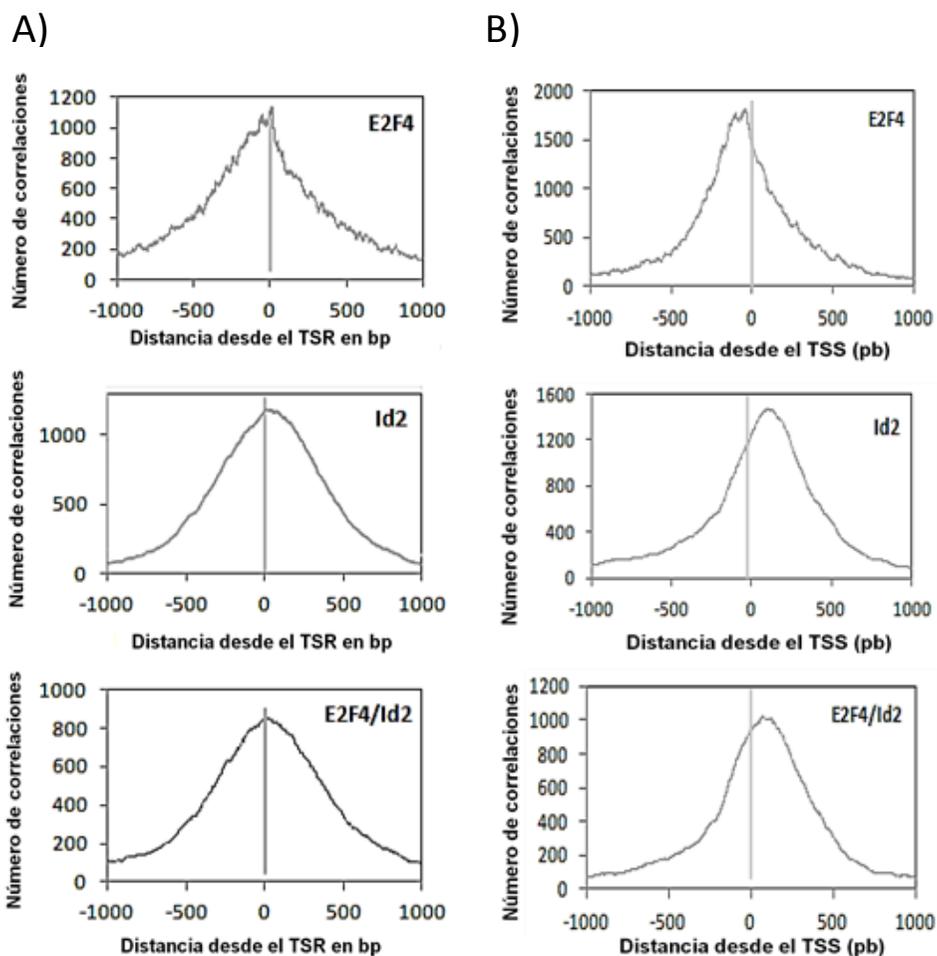


Figura 38: Distribución y localización de los sitios de unión de Id2, E2F4 y E2F4/Id2. Se representa el número de correlaciones entre la región a la que se une cada factor y A) la distancia respecto al centro del TSR (0) o B) la distancia respecto al TSS (0). El pico indica la región a la que se une con mayor frecuencia cada factor para la totalidad de los genes encontrados.

Sin embargo, las regiones de unión de E2F4 e Id2 mostraron una gran diferencia de posición con respecto al TSS. La unión de E2F4 se vio principalmente restringida a posiciones inmediatamente anteriores al TSS en dirección 5' (con una distancia más frecuente de -38pb del TSS), mientras que Id2 se encontraba con más frecuencia unido a una región posterior al TSS (distancia más frecuente a +125pb). Es destacable mencionar que Id2, sólo o con E2F4, mostró la misma posición respecto al TSS (**Figura 38b**).

Además, Id2 presentaba una distribución más dispersa en los promotores de los genes diana que aquellos que solo unían E2F4. Id2 mostraba un pico más amplio de correlaciones (**Figura 38**). El análisis de la ubicación del factor de todo el genoma mostró que, mientras que la longitud media de las regiones que cubría E2F4 era de 24pb, los factores Id2 o E2F4/Id2 cubrían una región más grande, con una longitud media de 277pb. Puesto que Id2 carece de un dominio de unión a DNA, este resultado podría reflejar la unión de un complejo de proteínas al que podría estar uniéndose Id2.

III.2.3. Caracterización del sitio de unión del complejo E2F4/Id2.

Con la finalidad de profundizar más en el papel que desempeña Id2 en el hígado quiescente, se caracterizó la región de unión de E2F4/Id2 en los promotores de los genes diana. Se piensa que las secuencias de DNA altamente conservadas entre especies tienen un

papel regulador fundamental. En este sentido, el análisis estadístico de 550 sondas positivas para el complejo E2F4/Id2 muestra que el 83,3% tienen una región ortóloga en *Homo sapiens* y en *Rattus norvegicus*. Se encontraron 5 motivos putativos con un umbral de similitud de la matriz del 0,80 en al menos un 75% de las regiones ortólogas (**Tabla V**) y un *core* putativo, presente en al menos un 95% de secuencias estudiadas (**Figura 39**).

Tabla V

Motivo de unión	Re-valor	IUPAC consenso
U\$s1_E2F4_Id2_ortolo	1.55	NGCAGCCRS
U\$s2_E2F4_Id2_ortolo	4.19	NGAGGAGCS
U\$s3_E2F4_Id2_ortolo	1.13	NGCNGGAGS
U\$s4_E2F4_Id2_ortolo	2.80	NGAGCAGCN
U\$s5_E2F4_Id2_ortolo	2.70	NGGAGCTGN

Tabla V. Caracterización de la secuencia de unión de E2F4/Id2. Motivos putativos encontrados en los promotores génicos en al menos 75% de las regiones ortólogas. Umbral de similitud de la matriz del 0,80.

Además, se encontró que el sitio de unión para E2FF está presente en el 89% de las secuencias. Sin embargo, no pudimos encontrar un módulo concluyente (combinación de sitios de unión para E2FF y otro factor de transcripción) presente en un número significativo de regiones. No obstante, las regiones analizadas

siempre contenían sitios de unión para factores relacionados con el inicio de la transcripción (resultados no mostrados).

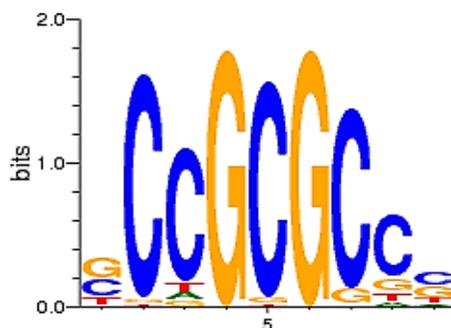


Figura 39. Secuencia común en los promotores de los genes diana de E2F4/Id2. Core element presente en al menos el 95% de las secuencias downstream del TSS en genes diana de E2F4/Id2 analizado mediante GEMS launcher. Umbral de similitud de la matriz de 0,80.

III.3 Posible papel de Id2 como nodo de coordinación en diferentes procesos biológicos en el hígado: Funciones moleculares y biológicas de los genes a los que se une E2F4/Id2.

Con el fin de determinar si E2F4/Id2, ejerce su función sobre una selección específica de genes, se analizó funcionalmente el conjunto de genes diana de E2F4/Id2.

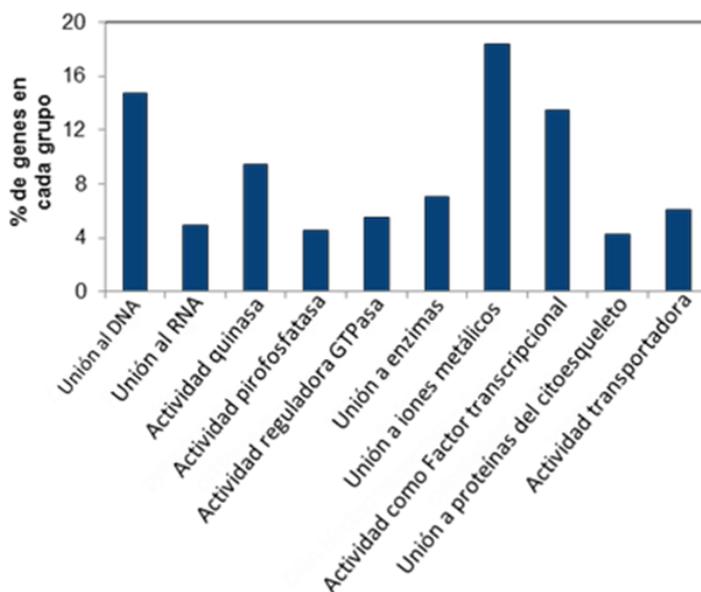


Figura 40: Funciones moleculares de genes diana de E2F4/Id2. El porcentaje se refiere al número de genes que se encuentran dentro de una categoría particular en relación con el número total de genes a los que se une E2F4/Id2. En algunos casos, los genes pueden estar incluidos en más de una categoría.

Como se puede observar en la **Figura 40**, las funciones moleculares más representativas para los genes diana de E2F4/Id2 se agrupan en categorías relacionadas con la unión al DNA, la unión a iones metálicos y factores de transcripción. Por otra parte, la mayoría de los genes a los que se une E2F4/Id2 se agrupan en cuatro funciones biológicas principales (**Figura 41**): señalización, transcripción de genes, ciclo celular y crecimiento, y procesos de desarrollo y diferenciación.

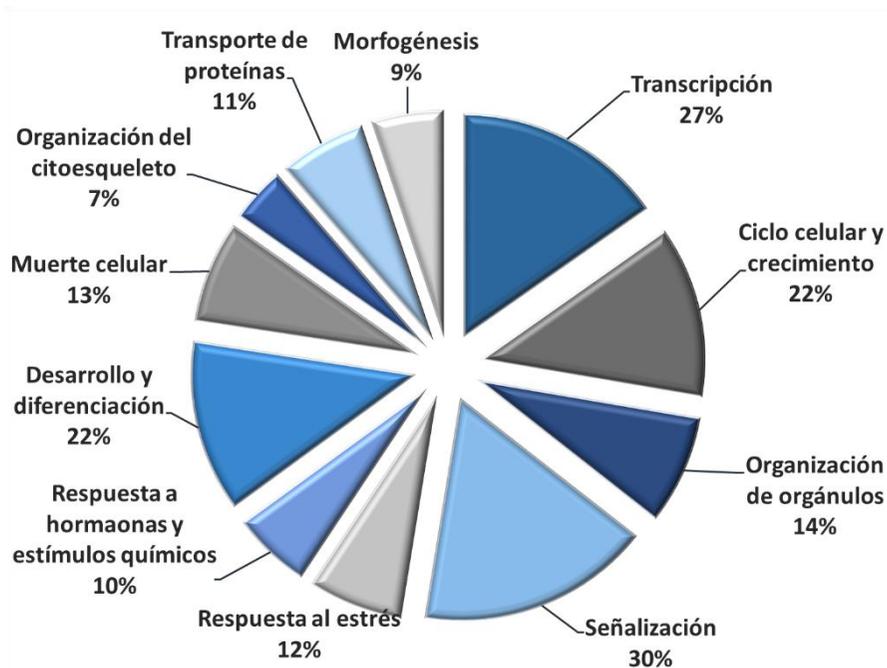


Figura 41: Distribución de los genes a los que se une el complejo E2F4/Id2 según sus funciones biológicas. Porcentaje de los genes diana de E2F4/Id2 englobados dentro de los procesos biológicos más importantes en los que se han descrito.

Posteriormente, para determinar el posible proceso biológico en el que están implicados los genes diana de Id2, nos propusimos determinar posibles diferencias, a nivel biológico y molecular, entre los genes que sólo unen E2F4 y los genes que unen el complejo E2F4/Id2. Para ello, se analizaron las funciones moleculares (**Figura 42**) y biológicas (**Figura 43**) de los genes que unían el complejo E2F4/Id2 o E2F4 solo, en términos de enriquecimiento frente al total de genes que unían E2F4. Como resultado de este análisis, se obtuvo una clara diferencia entre los dos grupos de genes.

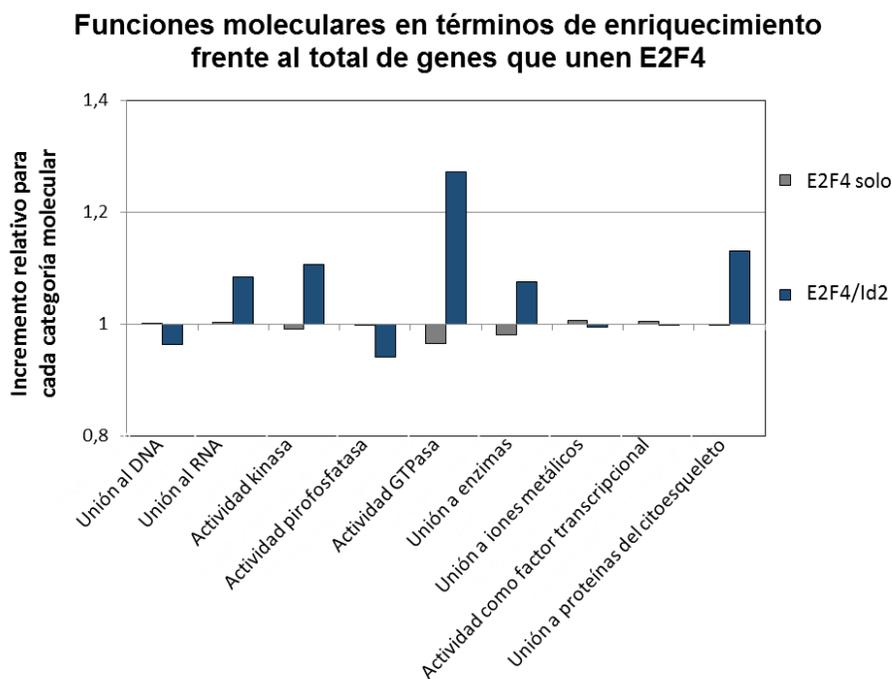


Figura 42. Distribución de las funciones moleculares de genes que unen E2F4/Id2 o tan sólo E2F4. Las barras azules y grises representan al grupo de genes unidos por E2F4/Id2 o por E2F4 sólo. Los datos se muestran como las veces enriquecido en E2F4/Id2 o solo E2F4 en comparación con el total de genes diana de E2F4.

En lo que respecta a la función biológica, se observó que los genes que unen Id2 están implicados en funciones relacionadas con la organización de la cromatina, el citoesqueleto y los orgánulos, así como el desarrollo, la diferenciación y morfogénesis, el transporte de RNA y de proteínas (**Figura 43**).

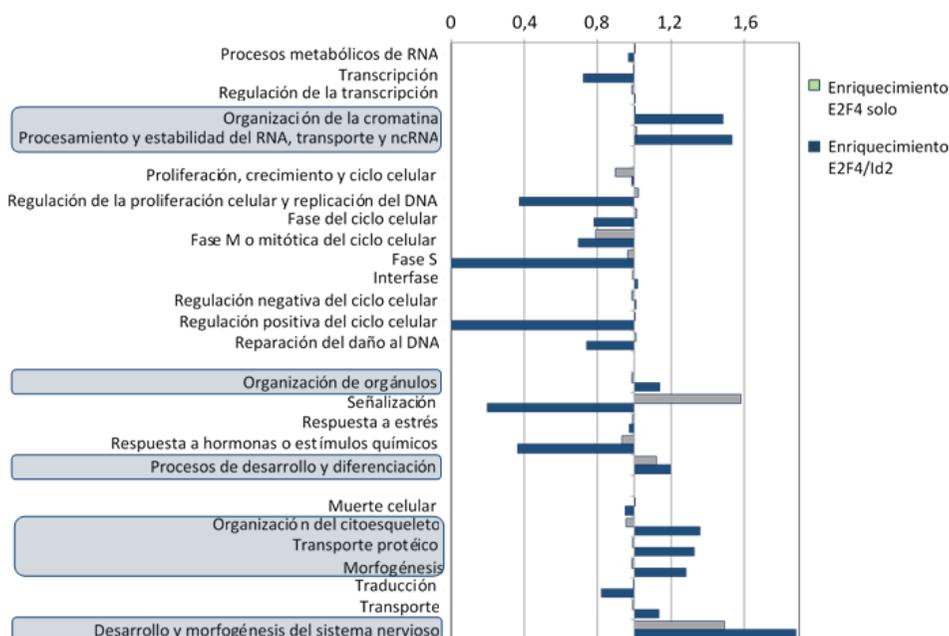


Figura 43. Distribución de las funciones biológicas en las que se agrupan los genes que unen E2F4/Id2 o tan sólo E2F4. Las barras azules y grises representan al grupo de genes unidos por E2F4/Id2 o por E2F4. Los datos se muestran como las veces enriquecido en E2F4/Id2 o solo E2F4 en comparación con el total de genes diana de E2F4.

La reagrupación de los genes de forma que fueran anotados como genes únicos dentro de una categoría en particular, mostró que los genes diana de Id2 se relacionan fundamentalmente con el desarrollo. Sin embargo, nuestros datos de CHIP/chip no derivan de un análisis de hígado fetal, sino de muestras de hígado procedente de ratones adultos. Para estudiar el impacto final que E2F4/Id2 podría tener sobre la modulación de la expresión génica en hígado de ratón adulto frente al obtenido tan sólo con la unión de E2F4, se realizó un análisis *in silico* del patrón de expresión génica para cada

grupo de genes (Mortazavi et al. 2008). La mayor parte de los genes unidos por E2F4, en presencia o ausencia de Id2, estaban reprimidos o mostraron un nivel de expresión muy bajo en hígado adulto (97 % del total de genes) (**Figura 44**).

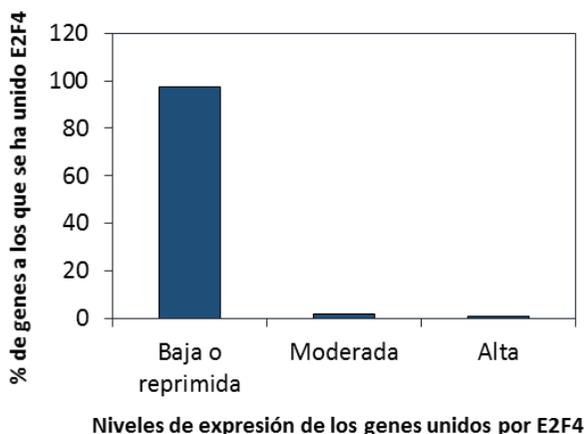
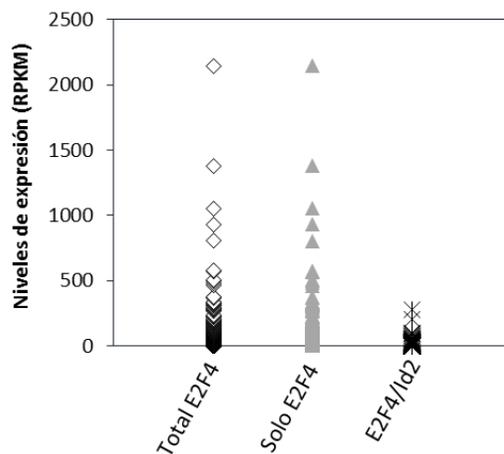


Figura 44. Niveles de expresión de los genes diana de E2F4. Análisis “in silico” de la expresión de todos los genes diana de E2F4 en el hígado de adultos (Mortazavi A et al 2008). El porcentaje de genes diana para E2F4 se representa gráficamente en función de sus niveles de expresión basales.

Hay un pequeño subconjunto de los genes unidos solo por E2F4 que presentan una expresión génica de moderada a alta (**Figura 45a**). Las funciones biológicas de los genes diana de E2F4, que muestran una alta expresión, se relacionan principalmente con funciones metabólicas y con la regulación de la homeostasis del hígado (**Figura 45b**). Por lo tanto, estos datos sugieren que el complejo E2F4/Id2 podría ser parte de un complejo represor en el hígado adulto.

A)



B)

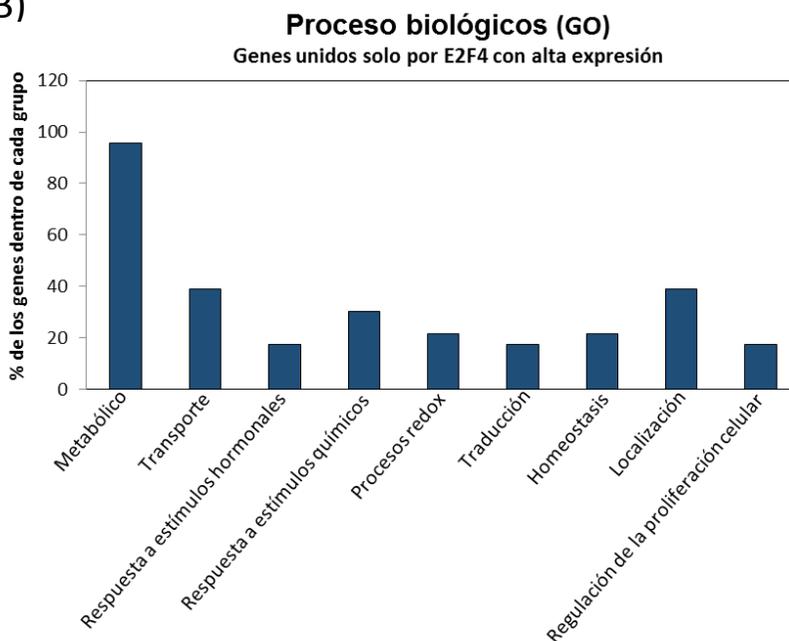


Figura 45. Distribución de las funciones biológicas GO de los genes que solo unen E2F4 y que se encuentran altamente expresados en hígado quiescente de ratón. A) Análisis “in silico” de los niveles de mRNA de la totalidad de genes que unen E2F4, sólo E2F4 o E2F4/Id2. Los niveles de mRNA de los datos obtenidos del RNAseq (Mortazavi A et al 2008) se representan como lecturas por kilobase por millón de lecturas (RPKM). **B)** Se muestra el porcentaje de genes implicados en los procesos biológicos más significativos en los que han sido descritos.

III.4 Relación entre el *input* y el *output* primario: Dinámica de unión de Id2 a los promotores en el desarrollo hepático y correlación con la expresión génica.

Los resultados sugieren que E2F4/Id2 podría formar parte de un complejo represor sobre un subgrupo de genes que juegan un papel importante durante el desarrollo hepático. De acuerdo con esta hipótesis, se realizó un análisis *in silico* comparando los niveles de expresión de los genes unidos por E2F4/Id2 en hígado fetal y adulto (Otu et al. 2007). De acuerdo con nuestra hipótesis, se observó una mayor expresión de los genes diana de E2F4/Id2 en el hígado fetal (**Figura 46**).

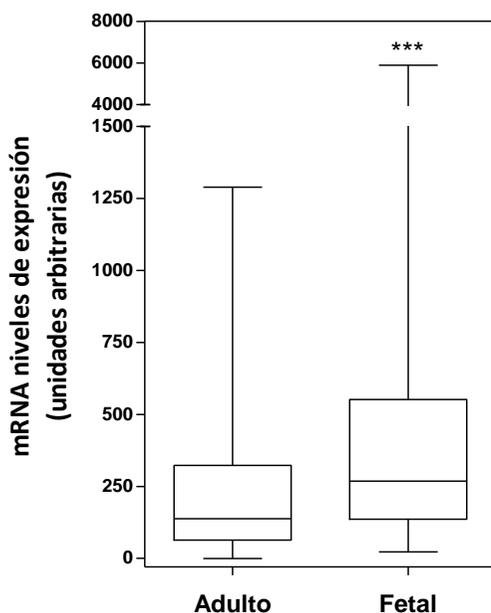


Figura 46. Análisis *in silico* de la expresión de genes diana de E2F4/Id2 en hígado adulto y fetal. Se muestra un diagrama de cajas y bigotes donde se representa los niveles de mRNA, en unidades arbitrarias, en hígado adulto y fetal. *** P-valor < 0.0001.

Por lo tanto, nos preguntamos si la presencia o ausencia de Id2 unido al complejo, se correlacionaba con una mayor o menor expresión de los genes diana durante el desarrollo del hígado. Por este motivo, se analizó la unión del complejo E2F4/Id2 a la región *downstream* del TSS en una representación de genes relacionados con la organización de la cromatina y el procesamiento del RNA en muestras de hígado de ratón adulto y fetal.

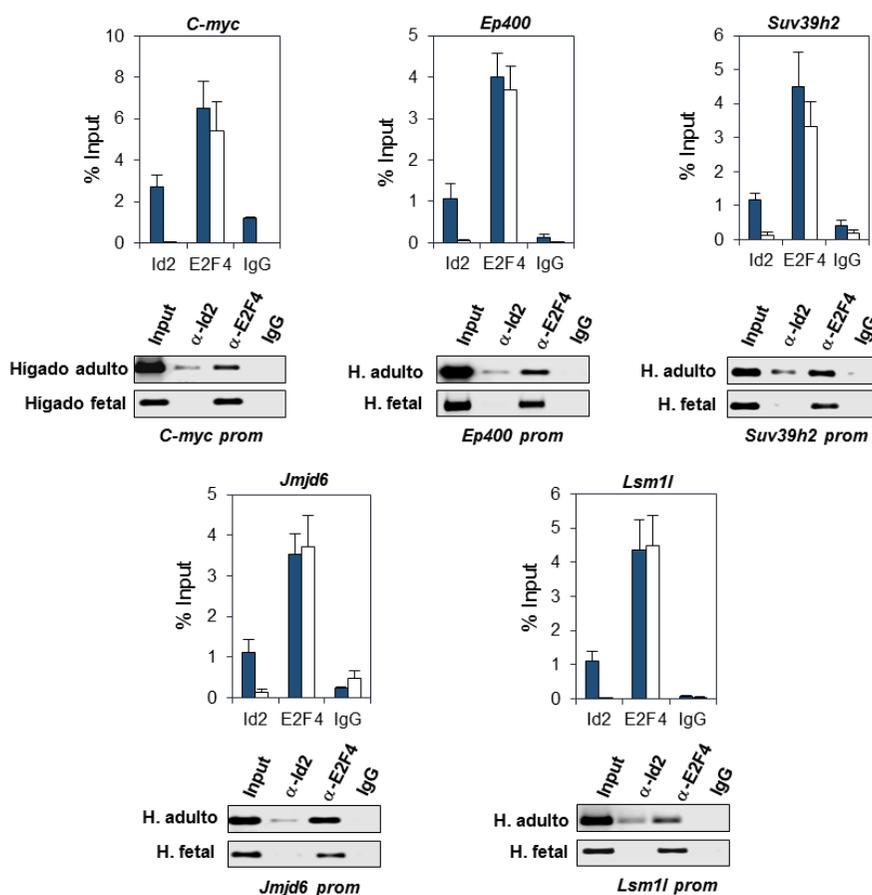


Figura 47. Unión de E2F4 e Id2 a los promotores génicos en hígado fetal y adulto. La unión de E2F4 e Id2 a la región *downstream* del TSS se analizó mediante CHIP assay en muestras de hígado adulto (barras azules) y fetal (barras blancas). Se muestra el resultado del análisis de los ChIPs por qPCR (superior) y por PCR semicuantitativa (inferior) en una selección de genes. Como control positivo en el hígado quiescente, se analizó la unión de E2F4/Id2 al promotor de *c-myc*. ($n=3$) $P < 0.05$.

Como se puede observar en la **figura 47**, Id2 se encontraba unido a todos los genes analizados en hígado adulto quiescente, validando los datos del ChIP/chip. Sin embargo, Id2 no se encontraba unido a esta región en ninguno de los genes analizados en hígado fetal.

Posteriormente, mediante qPCR se analizaron los niveles de mRNA de los genes seleccionados. Se comprobó que la ausencia de Id2 de estas regiones se correlacionaba con una mayor expresión de los genes diana seleccionados (**Figura 48**). Este aumento de la expresión génica observado en hígado fetal en comparación con los niveles de expresión en hígado adulto, apoyaría la hipótesis de que Id2 podría tener un papel represivo en un subgrupo de los genes diana para E2F4 en células diferenciadas. En efecto, Id2 no se encuentra unido a los promotores de los genes diana durante el desarrollo hepático, momento en el que dichos genes se están expresando.

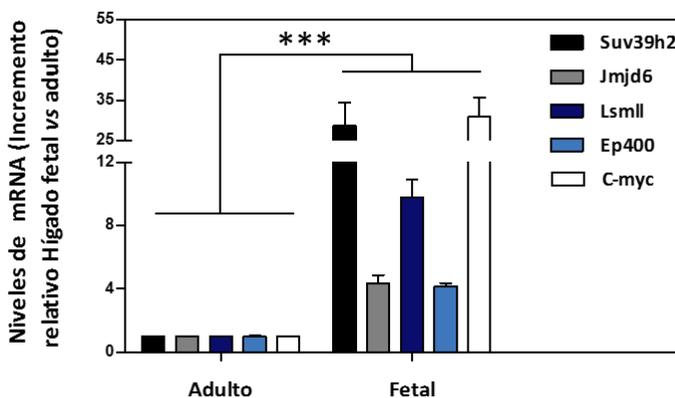


Figura 48. Niveles de expresión de genes relacionados con el desarrollo a los que se une E2F4/Id2 en hígado adulto y fetal. Niveles de mRNA de genes incluidos en la categoría de desarrollo mediante RT-qPCR en muestras de hígado fetal y adulto de ratón. Los valores de expresión se normalizaron respecto a la expresión del gen 18S. Incremento relativo respecto a la expresión del hígado adulto. *** corresponde a un P-valor < 0.0001.

III.5 Modulación de la abundancia y distribución subcelular de Id2 durante el desarrollo hepático.

Los niveles de Id2 y su distribución subcelular se han considerado clásicamente como factores determinantes de su función. En general, sus niveles suelen ser elevados en células en proliferación y bajos en células quiescentes o diferenciadas. En cualquier caso, Id2 es una proteína pleiotrópica cuyas funciones dependerán en gran medida del microambiente en el que se encuentre (Yokota & Mori, 2002). En este sentido, aunque la modulación de los niveles de Id2 y su correlación con su función han sido ampliamente estudiadas en otros tejidos, durante el desarrollo fetal éstas no han sido analizadas en hígado.

III.5.1 Análisis de los niveles de mRNA de Id2.

Los datos en la literatura indican que el control transcripcional de Id2 es uno de los puntos más importantes de control de su abundancia (García-Trevijano et al. 2013). Además, se han podido correlacionar los niveles de expresión de Id2 con la tasa de proliferación celular (Ruzinova & Benezra, 2003; Coma et al. 2010). Por lo tanto, durante el desarrollo hepático, cuando hay una elevada tasa de proliferación celular, cabría esperar que se produjesen importantes cambios en los niveles de mRNA de Id2. Sorprendentemente, mediante qPCR se observó que la expresión de Id2 en hígado fetal no era significativamente diferente a la del hígado adulto (**Figura 49**).

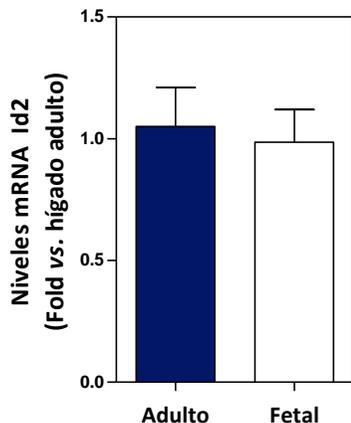


Figura 49. Niveles de mRNA de Id2. Niveles de expresión de Id2 mediante RT-qPCR en muestras de hígado fetal de 14 días de desarrollo e hígado adulto de ratón. Los valores se normalizaron respecto a la expresión del gen 18S. Incremento relativo respecto a la expresión del hígado adulto. (n = 5).

III.5.2. Estudio de la estabilidad proteica de Id2 y posible papel de USP1.

La proteína USP1 es capaz de estabilizar y aumentar los niveles de la proteína Id2 en tumores de osteosarcoma (Williams et al. 2011). Como se muestra en la **figura 50a**, tanto la proteína Id2 como los niveles de USP1 estaban incrementados durante el desarrollo del hígado. Puesto que se ha descrito que la estabilización de Id2 por USP1 depende del reconocimiento e interacción entre ambas proteínas (Williams et al. 2011), se realizó una co-immunoprecipitation de ambas proteínas confirmando dicha interacción durante el desarrollo hepático (**Figura 50b**).

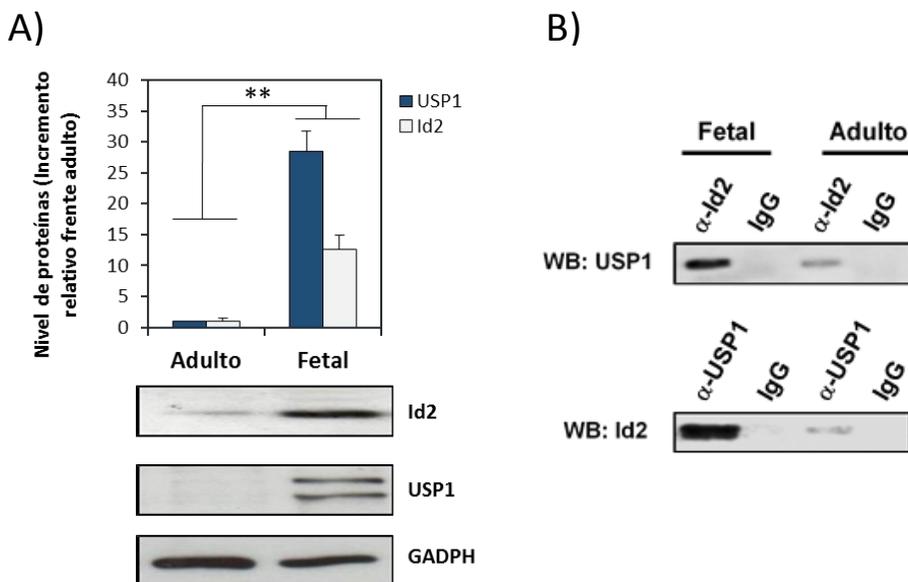


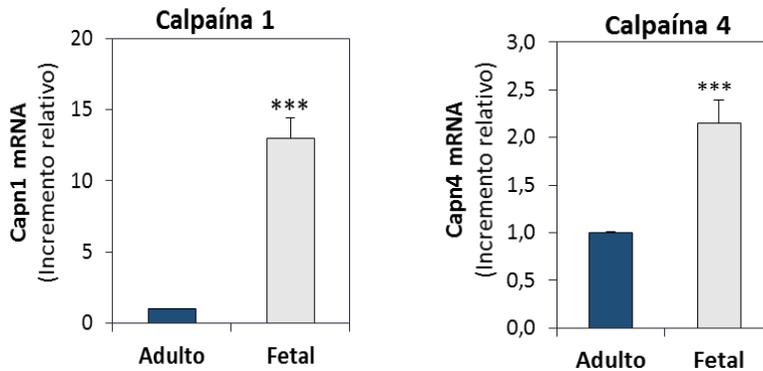
Figura 50. Niveles de expresión e interacción de Id2 y USP1 **A)** Análisis por WB de los niveles de Id2 y USP1 en hígado fetal y adulto. Los niveles de proteína se cuantificaron y se normalizaron respecto a los niveles de GAPDH. Los datos se presentan como la media \pm SEM ($n=5$). ** $P < 0.001$ vs hígado adulto. **B)** Co-immunoprecipitation de Id2 y USP1. Las muestras de hígado fetal y adulto se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-Id2, anti-USP1 o IgG de suero normal y posteriormente analizados por WB con el anticuerpo correspondiente. Se muestra un experimento representativo ($n \geq 3$).

Recientemente se ha descrito que la calpaína 1 junto con su subunidad reguladora (Capns1 o calpaína 4), juegan un papel clave en la modulación de la estabilidad de Id2 mediada por USP1. La Capn1 es capaz de estabilizar la deubiquitinasa USP1, aumentando sus niveles y favoreciendo su interacción con Id2 (Cataldo et al. 2013). Se analizó por tanto, la posible implicación de la Capn1 y Capn4 en la estabilización de Id2 mediada por USP1.

Se observó un aumento significativo de la expresión de ambas subunidades durante el desarrollo fetal, tanto a nivel de mRNA

(Figura 51a), como a nivel de proteína (Figura 51b). Sin embargo, no se pudo demostrar la interacción directa de Capn1/USP1 mediante experimentos de co-inmunoprecipitación (resultados no mostrados).

A)



B)

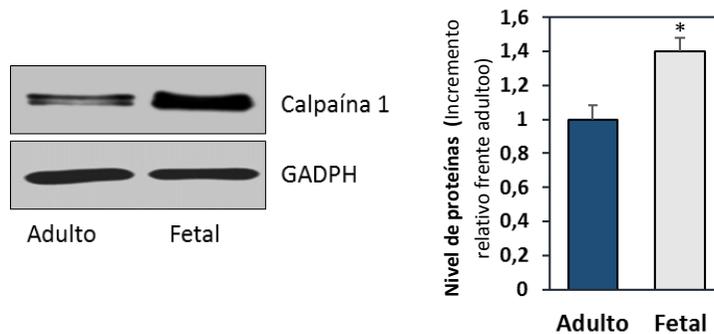


Figura 51. Niveles de expresión de calpaínas durante el desarrollo hepático. A) Niveles de expresión de calpaína 1 y 4 por RT-qPCR en muestras de hígado fetal y adulto. Los valores se normalizaron con respecto a la expresión del 18S. Incremento relativo respecto a la expresión en hígado adulto. *** corresponde a un P-valor < 0.0001. (n = 5) **B)** Expresión de Capn 1 mediante WB en extractos de hígado fetal y adulto. Como marcador de carga se utilizó un anticuerpo específico contra GADPH. (n=5) * P < 0.05 vs hígado en adultos.

Por otra parte, los niveles de mRNA de USP1 se encontraban aumentados en hígado fetal con respecto al hígado adulto. Aunque no podemos descartar un posible papel de las calpaínas sobre la estabilización de la proteína USP1 y su actividad, nuestros resultados sugieren que el aumento de los niveles de proteína observado en hígado fetal, este causado por un aumento de los niveles de mRNA, y no de la vida media de la proteína USP1 (**Figura 52**).

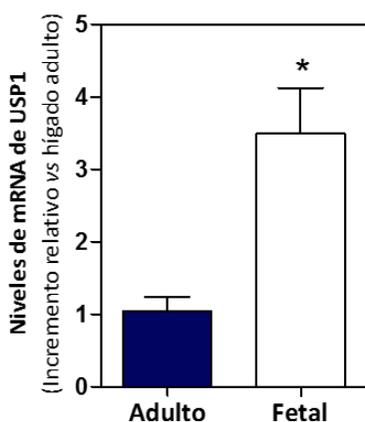


Figura 52. Niveles de mRNA de USP1. Niveles de expresión de USP1 mediante RT-qPCR en muestras de hígado fetal y adulto. Los valores se normalizaron con respecto a la expresión del 18S. Incremento relativo respecto a la expresión del hígado adulto. * corresponde a un P-valor < 0.05 (n = 5).

III.5.3. Distribución subcelular de Id2 y USP1.

Según los datos publicados en la literatura, las funciones de Id2 y USP1 se relacionan principalmente con procesos nucleares. En consonancia con esta idea, mediante *Western blot*, se observó que tanto Id2 como USP1 se localizaban principalmente en los núcleos

de hígado fetal (**Figura 53**). La pequeña cantidad de Id2 que se detectó en el citosol de hígado fetal, probablemente se deba a una síntesis activa de esta proteína. En el hígado adulto, Id2 presentaba una localización exclusivamente nuclear y con unos niveles casi indetectables. Curiosamente, en el hígado adulto no sólo se encontró una reducción considerable de USP1, sino también una distribución subcelular diferente, concretamente citosólica. Como se observa en la **figura 53**, la localización nuclear de Pol II, y la citosólica de GAPDH (utilizados ambos como marcadores de pureza del fraccionamiento subcelular) muestran la especificidad de los resultados.

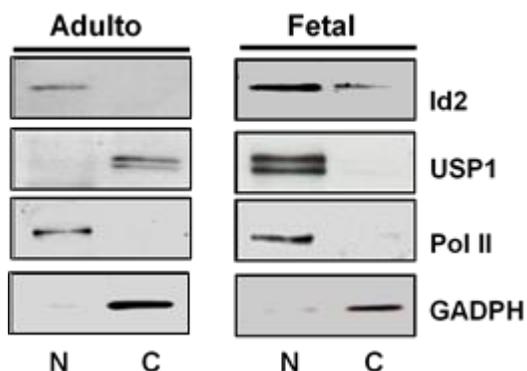


Figura 53. Distribución subcelular de Id2 y USP1. Western blot de Id2 y USP1 en las fracciones nucleares y citosólicas de muestras de hígado adulto y fetal. La pureza de los extractos se evaluó mediante anticuerpos específicos de nucleos (Pol II) y citosoles (GAPDH). N: Fracción nuclear, C: Fracción citosólica. (n = 5).

III.6 Papel de Id2 en la ocupación nucleosomal y el pausado de Pol II en la región *downstream* del TSS durante el desarrollo hepático.

La importancia funcional de las regiones con un contenido elevado en GC es poco conocido y controvertido. Según predice el algoritmo de Kaplan los promotores con un elevado contenido en GC deberían estar ocupados por un nucleosoma. Este algoritmo puede predecir con cierta exactitud la probabilidad de que en un determinado tramo de DNA se encuentre un nucleosoma. Sin embargo, se ha demostrado que la mayoría de estos promotores tienen pre-ensamblados Pol II (Gilchrist et al. 2010; Ramirez-Carrozi et al. 2009). En este sentido, los genes que requieren un control de la expresión más preciso, presentan una Pol II pausada en sus promotores (Gilchrist & Adelman, 2012). Por estos motivos, nos propusimos estudiar el contenido en GC, así como la ocupación nucleosomal o la presencia de una Pol II pausada en la región promotora de algunos de los genes diana de E2F4/Id2.

La histona arginina desmetilasa *Jmjd6* y la histona metiltransferasa *Suv39h2*, son una buena representación de los genes diana del complejo E2F4/Id2 ya que son esenciales para la diferenciación de múltiples células y tejidos durante la embriogénesis (Lee et al. 2012b; Peters et al. 2001). Por lo tanto, se han seleccionado estos genes con el fin de estudiar si Id2 podría favorecer la ocupación nucleosomal, o por el contrario, favorece el pausado de la Pol II en las regiones *downstream* del TSS de los

genes diana de E2F4/Id2, que se encuentran enriquecidos en las categorías funcionales determinadas previamente.

III.6.1. Análisis del contenido en GC respecto al TSS en los genes diana de E2F4/Id2.

El inicio de la transcripción está facilitado por la presencia de islas CpG en los promotores (Ramirez-Carrozzi et al. 2009). Nuestros datos mostraron un *core element* que se caracterizaba por un elevado número de GC (**Figura 39**). Se analizó, por tanto el contenido en GCs respecto al TSS y a las regiones a las que se unen preferentemente los distintos complejos analizados. El análisis del contenido de GC de las secuencias promotoras a las que se unía E2F4, Id2 y el complejo E2F4/Id2, mostró una clara diferencia entre los tres grupos (**Figura 54**).

En este análisis se pudo observar que Id2 y el complejo E2F4/Id2 se unían con mayor frecuencia a una región con un mayor porcentaje de GCs que la región a la que se une E2F4-solo, localizada principalmente *upstream* del TSS.

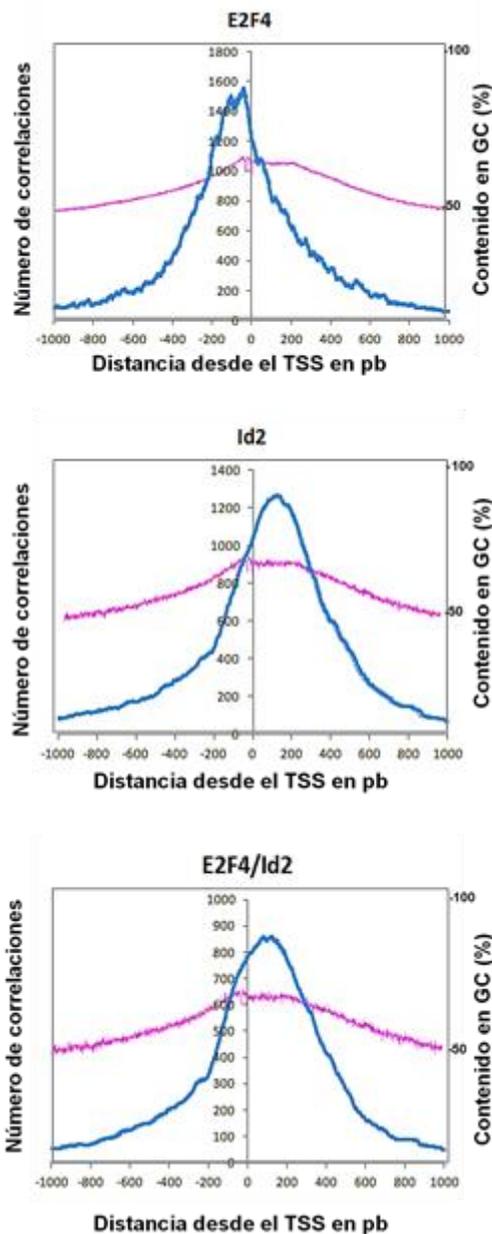


Figura 54. Análisis del contenido en GC en las regiones a las que se une E2F4, Id2 o E2F4/Id2. Los datos del microarray, analizados mediante el GenomInspector, se representaron como el número de correlaciones encontradas respecto a la distancia al TSS en pb (línea azul). La línea púrpura indica el porcentaje de GC (eje de la derecha) en la totalidad de genes a los que se une cada factor frente a la distancia al TSS.

III.6.2 Análisis de ocupación nucleosomal mediante ensayo de protección frente a MNasa.

Se realizaron ensayos de protección frente a MNasa en la regiones *downstream* del TSS, donde se une el complejo E2F4/Id2, en muestras de hígado de ratones adultos y fetales. Como se observa en la **figura 55**, *Jmjd6* presenta una región protegida centrada principalmente a +240pb del TSS, mientras que *Suv39h2* a +340pb. Curiosamente, estas regiones se encuentran significativamente más protegidas en hígado fetal, cuando ambos genes están transcripcionalmente activos.

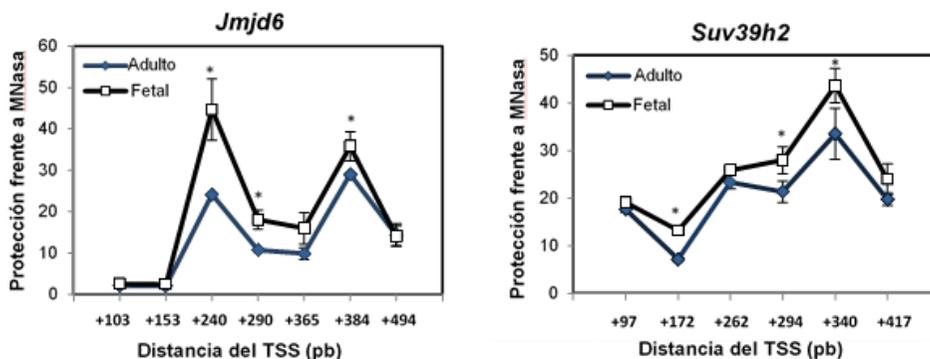


Figura 55. Análisis de posicionamiento nucleosomal de los genes *Jmjd6* y *Suv39h2* en hígado fetal y adulto. El posicionamiento nucleosomal en *Jmjd6* y *Suv39h2* se analizó en muestras de hígado fetal y adulto mediante ensayos de protección frente a MNasa en las regiones downstream del TSS. Las regiones protegidas en *Jmjd6* (izquierda) y *Suv39h2* (derecha) se representan según el número de veces enriquecido frente a la distancia al TSS. Cada punto indica el centro del amplicón. Se representa la media \pm SEM ($n = 3$). * P -valor $< 0,05$ vs hígado adultos.

III.6.3. Análisis de la ocupación nucleosomal o del pausado de Pol II en los genes diana de E2F4/Id2 durante el desarrollo hepático.

Puesto que el ensayo de protección frente a MNasa no discrimina entre la ocupación nucleosomal y la unión de una Pol II pausada, se realizó un ensayo de Nuc-ChIP con anticuerpos contra Pol II e histona H3 con el fin de determinar la identidad de las proteínas unidas a la región protegida de ambos genes.

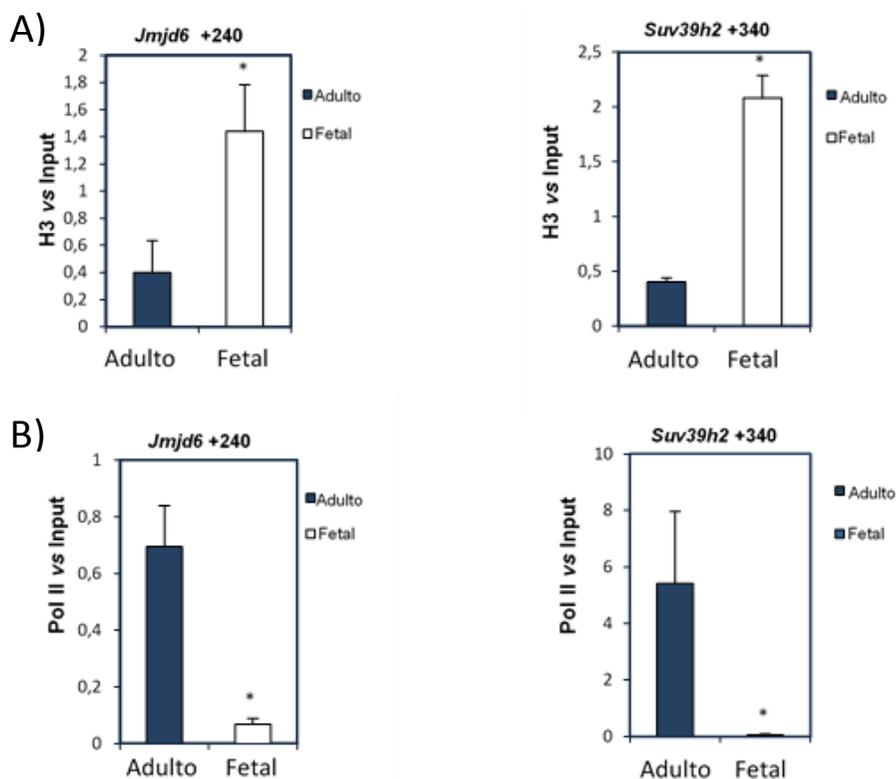


Figura 56. Identificación de los complejos unidos a las regiones protegidas frente a MNasa en *Jmjd6* y *Suv39h2* en hígado fetal y adulto. Las proteínas unidas a las regiones protegidas se identificaron mediante Nuc-ChIP de mononucleosomas procedente de hígado fetal y adulto con anticuerpos **A)** anti-histona H3 o **B)** anti-Pol II. Los amplicones se centran en +240 y +340 pb del TSS para *Jmjd6* y *Suv39h2* respectivamente. Se representa la media \pm SEM ($n = 3$). * P -valor $< 0,05$ vs hígado adulto.

Se encontró Pol II unida a la región protegida de hígado adulto en ambos genes (**Figura 56b**). Sin embargo, en hígado fetal, cuando ambos genes están transcripcionalmente activos, la región protegida estaba ocupada principalmente por un nucleosoma, como se puede deducir por la presencia de la histona H3 (**Figura 56a**).

Por lo tanto, parece ser que durante el desarrollo, cuando los genes están transcripcionalmente activos, se posiciona un nucleosoma en la región downstream del TSS. Por otro lado, se produce un pausado de Pol II cuando Id2 se encuentra unido en estas regiones *downstream* del TSS de los genes diana de E2F4/Id2.

III.7 Reversibilidad del pausado de Pol II y de la unión de Id2 a los promotores génicos al inicio de la regeneración hepática.

Uno de los genes donde se ha descrito una Pol II pausada en su promotor, es el oncogén c-myc (Krumm et al. 1992). La liberación de Id2 del promotor de c-myc durante la regeneración hepática tras la PHx produce un aumento de expresión del gen (Rodríguez et al. 2006). Hasta el momento, nuestros resultados sugieren que Id2 podría formar parte de un programa de diferenciación favoreciendo el pausado de Pol II. Nos preguntamos si este programa de diferenciación podría ser reversible tras un determinado estímulo.

III.7.1 Dinámica de unión de Id2 a los promotores durante la regeneración hepática y correlación con la expresión génica.

La regeneración del hígado no es una recapitulación exacta del programa embrionario, sin embargo, ambos procesos comparten factores clave para promover la proliferación celular (Otu et al. 2007). Por este motivo nos propusimos evaluar si ocurre el mismo mecanismo de regulación en una selección de los genes E2F4/Id2 durante la regeneración hepática.

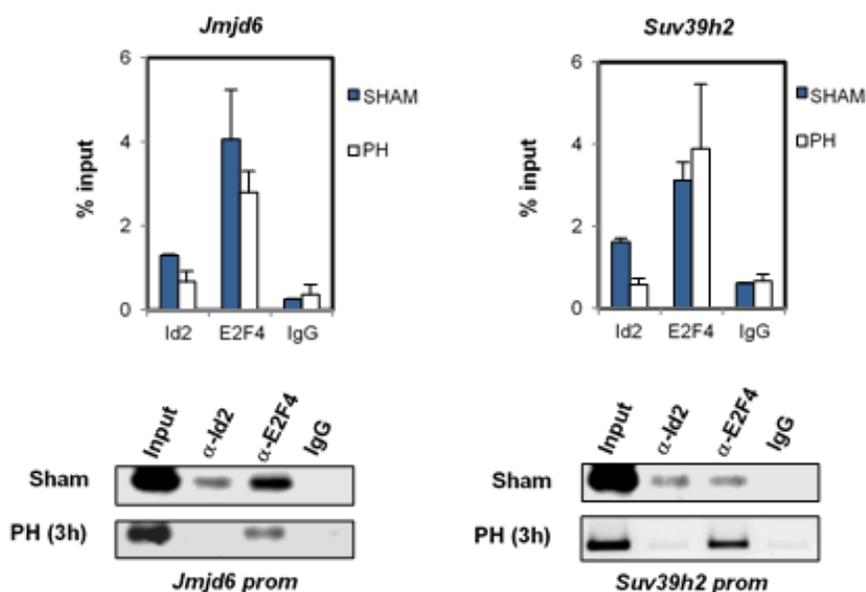


Figura 57. Análisis de la dinámica de unión de Id2 y E2F4 a los promotores de Jmjd6 y Suv39h2 durante la regeneración hepática. La cromatina de muestras de hígado a las 3h tras PHx u operación simulada (sham) se inmunoprecipitó con anticuerpos contra Id2, E2F4 o IgG de suero normal. Los ChIPs se analizaron por qPCR (superior) y PCR semicuantitativa (inferior) con primers específicos para la región promotora de Jmjd6 o Suv39h2. Se muestra un experimento representativo ($n = 3$). $P \leq 0.05$ para la unión de Id2 vs. Sham.

Mediante ChIP *assay*, demostramos que Id2 se encontraba unido al promotor de al menos dos de estos genes (*Jmjd6* y *Suv39h2*) en muestras de hígado tras una operación simulada (*Sham*). Sin embargo, tras la PHx, Id2 se libera de los promotores de ambos genes (**Figura 57**).

Como se puede observar en la **figura 58**, la expresión de ambos genes se correlacionaba con el patrón de unión de Id2 a los promotores de estos. Se observa que hay un aumento de la expresión cuando Id2 se libera de los promotores de *Jmjd6* y de *Suv39h2*.

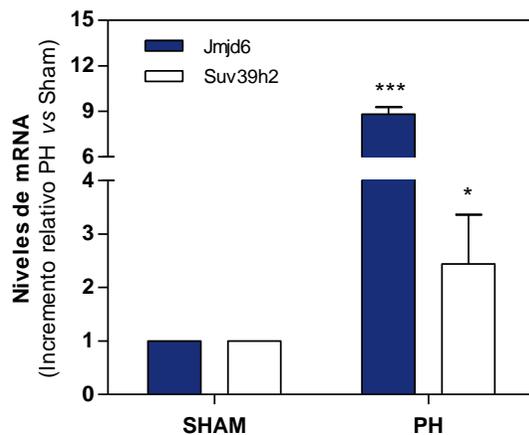


Figura 58. Niveles de expresión de *Jmjd6* y *Suv39h2* durante la regeneración hepática. Niveles de mRNA de *Jmjd6* y *Suv39h2* mediante RT-qPCR en muestras de hígado a las 3h tras PHx u operación simulada (*sham*). Los valores se normalizaron con respecto a la expresión del gen 18S. Los resultados de la RT-qPCR se presentan como el promedio \pm SEM ($n = 5$). Incremento relativo vs. *sham*. *** P-valor < 0.0001. * P-valor < 0.05.

III.7.2. Ocupación nucleosomal y pausado de Pol II en las región *downstream* del TSS durante la regeneración hepática.

Para determinar si Id2, al igual que ocurre durante el desarrollo hepático, podría favorecer el pausado de la Pol II en las regiones *downstream* del TSS de los genes diana para E2F4/Id2, se evaluó la presencia de nucleosomas o de Pol II en estas regiones tras la PHx.

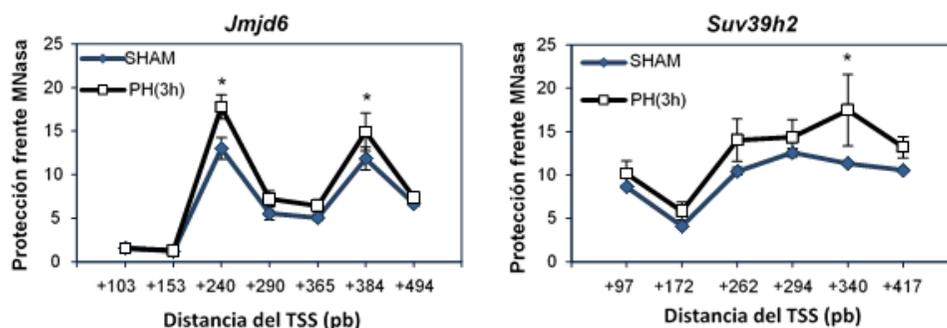


Figura 59. Análisis del posicionamiento nucleosomal en la región de unión de E2F4/Id2 durante la regeneración hepática. El posicionamiento nucleosomal en *Jmjd6* y *Suv39h2* se analizó en muestras de hígado a las 3h tras PHx o sham mediante ensayos de protección frente a MNasa en las regiones *downstream* del TSS. Las regiones protegidas en *Jmjd6* (izquierda) y *Suv39h2* (derecha) se representan según el número de veces enriquecido frente a la distancia al TSS. Cada punto indica el centro del amplicón. Se representa la media \pm SEM ($n = 3$).

Al igual que en hígado fetal, se observó el mismo perfil de protección frente MNasa en muestras de hígado hepatectomizado (Figura 59). En ambos casos, cuando se induce la expresión de los genes durante la regeneración hepática, Pol II se sustituye por un nucleosoma (figura 60). Es decir, tras la PHx se favorece el

reensamblaje nucleosomal en la región promotora ocupada previamente por una Pol II pausada.

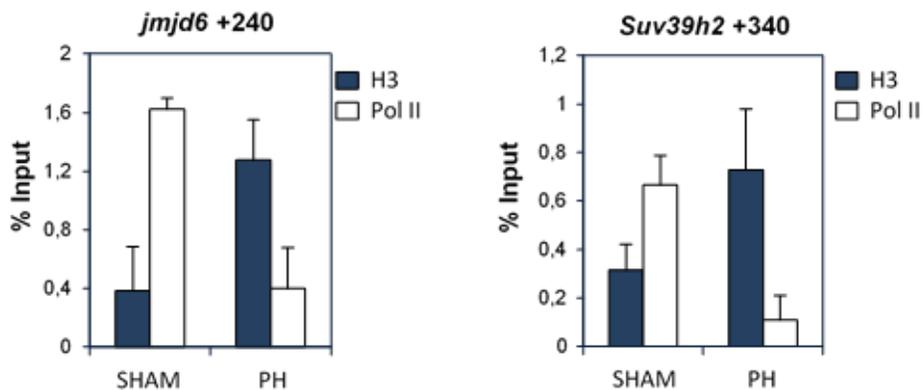


Figura 60. Identificación de los complejos unidos a las regiones protegidas frente a MNasa en *Jmjd6* y *Suv39h2* durante la regeneración hepática. Las proteínas unidas a las regiones protegidas se identificaron mediante Nuc-ChIP de mononucleosomas procedente de hígado a las 3h tras PHx o sham con anticuerpos anti- histona H3 (barras azules) o anti-Pol II (barras blancas). Los amplicones se centran en +240 y +340 pb del TSS para *Jmjd6* y *Suv39h2* respectivamente. Se representa la media \pm SEM ($n = 3$). * P-valor < 0,05 vs sham.

IV. Desregulación de los nodos transcripcionales y su relación con el cáncer.

IV.1 Análisis de la implicación de los genes diana NF-κB en cáncer.

Se ha descrito que NF-κB está involucrado en el desarrollo y progresión de tumores por la inducción de un ambiente inflamatorio (Chariot, 2009). Durante la involución de la glándula mamaria se produce un ambiente pro-inflamatorio. De hecho, como se ha mencionado en la introducción, la incidencia elevada de cáncer de mama asociado con el embarazo podría estar influenciado por el microambiente desarrollado en la glándula mamaria tras el destete (Lyons et al. 2011). Por lo tanto, mediante el programa GePS (Genomatix), se determinó que el 81% de los genes diana p65/p300 estaban relacionados con el cáncer. Por todo ello, es interesante seguir estudiando los mecanismos de regulación de estos genes, así como su función en este modelo de inflamación que tiene lugar durante la involución de la glándula mamaria tras la lactancia.

IV.2 Análisis de la implicación de los genes diana E2F4/Id2 en cáncer.

Como se ha comentado anteriormente, se ha descrito a Id2 en numerosas patologías, principalmente en cáncer (Norton, 2000;

Lasorella et al. 2001; Zebedee & Hara, 2001; Yokota & Mori, 2002; Fong et al. 2004; Coma et al. 2010). Por ese motivo nos propusimos estudiar si este mecanismo de regulación de la expresión génica podría estar relacionado con el cáncer o con algún otro tipo de enfermedad. De esta forma, se compararon los porcentajes de los genes que unen sólo E2F4 y los que unen el complejo E2F4/Id2, para cada patología en particular. Como se puede ver en la **figura 61**, hay un mayor porcentaje de genes que unen el complejo E2F4/Id2 que se han descrito en las diferentes patologías, entre las que destaca especialmente el cáncer, en comparación con los que solo unen E2F4.

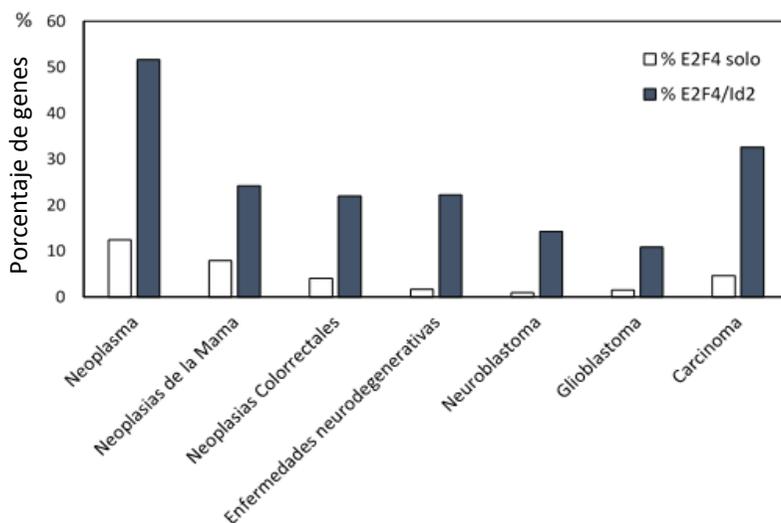


Figura 61. Sobrerepresentación de los genes diana de E2F4 sólo o E2F4/Id2 en distintas patologías. Los distintos grupos se analizaron mediante el *Generanker diseases*. Los resultados se representan como el porcentaje de genes que unen E2F4 sólo (blanco) o E2F4/Id2 (negro) sobrerepresentados en una determinada patología respecto al total de los genes diana para cada grupo. Sólo se representan aquellas condiciones patológicas con un $p \leq 0.0001$.

Por lo tanto, los resultados aquí mostrados representan una herramienta muy importante para la realización de nuevos estudios sobre los mecanismos que modulan los genes diana para E2F4/Id2 en cáncer.

DISCUSIÓN

I. Estudio de nodos de regulación de redes transcripcionales.

Como se ha mencionado en la introducción, los diferentes genes que componen el genoma están regulados por la unión de diferentes factores transcripcionales y otras proteínas reguladoras. Estos actuarían como *inputs* que se unen a los diferentes elementos en cis. Se podría decir por tanto, que las redes transcripcionales están constituidas por componentes reguladores o *inputs*, por los *outputs* de genes reguladores (*output* primario) y las dianas de dichos genes en la célula (*output* secundario) que, en última instancia, se manifestarán como un proceso biológico determinado (**Figura 1**).

Aunque cada gen recibe un gran número de inputs, no todos los inputs tienen la misma relevancia. De hecho, algunos de ellos pueden llegar a ser componentes críticos de las redes transcripcionales, tanto por sus efectos pleiotrópicos como por su destacado papel en el cáncer. Consecuentemente, en el trabajo que se presenta en esta tesis, se ha abordado el estudio de las redes transcripcionales valorando el papel de dos *inputs* diferentes, NF- κ B e Id2, como nodos de la regulación transcripcional en un contexto fisiológico en el que varios procesos biológicos y celulares se coordinan para generar un *output* final, la involución de la glándula mamaria y la diferenciación del tejido hepático respectivamente. Para ello, se han llevado a cabo varias aproximaciones:

- La identificación de los sitios de unión de cada *input* en los promotores de todo el genoma de ratón, así como los diferentes *outputs*, así como la contextualización del nodo de regulación en una categoría biológica funcional.
- Además, con objeto de proporcionar una mayor profundización en la dinámica de aquellos procesos modulados por NF- κ B o Id2, se han combinado los datos bioinformáticos con datos experimentales. Estos experimentos tratan de elucidar cuáles de los perfiles que derivan de la actividad de los *inputs*, se constituyen en un programa de expresión génica funcional. Lo que daría lugar a importantes factores de control que, propagando la señal a través de la red de regulación, contribuyen a la activación de otras vías o al *output* final.

II. La glándula mamaria en involución y el hígado como modelos de estudio de redes transcripcionales.

En el pasado, la Biología Molecular se ha centrado en la determinación de las funciones de tan sólo uno o unos pocos genes en un contexto biológico específico. Sin embargo, el análisis de amplios sistemas de regulación organizados en redes transcripcionales exige otro tipo de aproximaciones. En este trabajo, mediante aproximaciones experimentales que incluyen la inmunoprecipitación de un factor unido a la cromatina, seguido de

un microarray de promotores, se ha abordado el estudio del código de regulación transcripcional para dos factores, NF- κ B e Id2 en un contexto fisiológico en el que tienen lugar varios procesos biológicos, moleculares y celulares de forma simultánea y coordinada, la glándula mamaria en involución y el hígado adulto/fetal.

Las técnicas de genómica moderna tienen la capacidad de generar miles de datos sobre genes implicados en múltiples procesos biológicos, pero la validación funcional de dichos datos se realiza todavía alterando gen a gen. Se ha sugerido, que la variación que se encuentra en la naturaleza representa ya por sí misma un experimento de alteración multifactorial. La propia naturaleza constituye, por tanto, una herramienta potencial para la validación multigénica, siempre y cuando se sea capaz de conectar apropiadamente el genotipo y el fenotipo celular (Nuzhdin et al. 2010). Consecuentemente, todos los estudios que se presentan en esta tesis se han llevado a cabo *in vivo* en dos modelos fisiológicos en los que no se ha alterado de forma ectópica la expresión de ningún gen.

El patrón de expresión de p65 y p50, como se ha mencionado anteriormente, cambia a lo largo de la evolución de la glándula mamaria durante el ciclo embarazo/lactancia (Brantley et al. 2000; Geymayer & Doppler, 2000). Efectivamente, no sólo se produce un cambio de actividad del factor en las distintas fases del ciclo, si no que su patrón de expresión es crucial para el desarrollo de la glándula. En concreto, los estudios realizados con *knockouts* o *knokins* en los que se altera la activación o expresión del propio

factor o de algún miembro de la vía de señalización de NF- κ B, tienen como resultado el bloqueo de la proliferación lobulobronquial durante la gestación, el retraso de la involución o incluso el desarrollo tumoral (Cao & Karin, 2003; Romieu-Mourez et al. 2003).

Con respecto a los estudios de Id2, ya que la función de esta proteína está condicionada por su abundancia, se ha sugerido que cualquier alteración de sus niveles daría como resultado importantes cambios fenotípicos. Su función molecular vendrá determinada por un umbral de expresión en cada tipo celular. Incluso se ha postulado que los datos derivados de estudios en líneas celulares transformadas, podrían estar reflejando, antes que la verdadera función de Id2 objeto de estudio, las necesidades de unas células tumorales alejadas por completo de las condiciones fisiológicas. Para comprender el papel de Id2 como nodo de regulación transcripcional en un contexto fisiológico, deberíamos tener en cuenta que las actividades enzimáticas, las vías de señalización o incluso el estado redox de la célula cambian a través de las diferentes fases de cualquier proceso biológico. Una imagen estática de Id2 conduciría a confusión. La expresión de Id2 está sometida a un estrecho control, restringida a un tiempo concreto y coordinada con la expresión de otras proteínas (García-Trevijano et al. 2013).

Por todo lo expuesto anteriormente, con aproximaciones experimentales que implicaran la alteración de la expresión y/o actividad de Id2 o NF- κ B, no se podría obtener una información precisa de los nodos de regulación que controlan las redes

transcripcionales en condiciones fisiológicas. La información obtenida, aunque no carente de validez, estaría sesgada hacia un proceso biológico y se verían alteradas con ello las interacciones entre redes transcripcionales.

III. NF- κ B como nodo de regulación de redes transcripcionales durante la involución de la glándula mamaria.

III.1 Análisis genómico y output inicial o primario.

Nuestros resultados de ChIP/chip muestran que en la glándula mamaria, durante el proceso de involución, p65 se une a 4532 genes a las 48h tras el destete forzado de las crías. Los datos en la literatura referidos a la identificación de sitios de unión de factores de transcripción mediante el uso de tecnología ChIP/chip o ChIP/seq, muestran multitud de secuencias que son teóricamente funcionales para la unión de factores de transcripción. Paradójicamente, aunque se haya confirmado experimentalmente la unión de factores a dichas secuencias, se ha demostrado que no todas ellas participan en la regulación de sus genes diana en respuesta a un estímulo. Por ejemplo, el factor CREB es capaz de unirse aproximadamente a 4000 promotores del genoma humano *in vivo*, pero sólo una pequeña proporción de estos son capaces de ser inducidos por cAMP en cualquier tipo celular (Zhang et al.

2005). En el trabajo que se presenta en esta tesis hemos tratado de seleccionar solo aquellos genes diana de p65 transcripcionalmente activos.

Tal y como se comentó en la introducción, aunque p65 puede sufrir un variado número de modificaciones post-traduccionales, que pueden condicionar su unión al DNA o su actividad, es tan sólo a través de su unión a p300 cuando podrá presentar actividad transactivadora (Calao et al. 2008). En consonancia con los datos antes mencionados para otros factores de transcripción, tan sólo una pequeña proporción de los genes que unían p65 también unían p300 (268 genes) en la glándula mamaria a las 48h de involución (**Figura 15**).

Se podría argumentar que carecemos de evidencias claras que demuestren que p300 está siendo reclutado por NF- κ B y no por otro factor de transcripción en los genes diana. Aunque no podemos descartar dicha posibilidad, nuestros análisis de distribución genómica de regiones (**Figura 18**) y de localización genómica de cada grupo, p65 total, p300 total y p65/p300 (**Figura 19**) sugieren que efectivamente se han seleccionado aquellos genes que unen p65/p300. El patrón de distribución genómico de p65/p300 era distinto al de p65 total y además, como se observa en la **figura 19**, las curvas de localización de p65 respecto al TSS son más extensas y con los límites menos definidos que las de p65/p300. Todo ello revela una colocalización de p65 y p300. Finalmente, nuestros datos de expresión en muestras de glándula mamaria, Pol II-ChIP y CHIP assays, verifican que efectivamente

p300 se une a la misma región que p65 (**Figuras 20 y 21b**) en genes transcripcionalmente activos a las 48h tras el destete.

No obstante, no se descarta un posible mecanismo de inhibición de la actividad p65/p300 y la represión de algunos genes diana de NF- κ B. Este podría ser el caso del gen que codifica para el péptido similar a la hormona paratiroidea, uno de los genes identificados como diana de p65/p300, puesto que se ha descrito que este gen no se expresa en la glándula mamaria tras el destete (Thiede & Rodan, 1988). En este sentido, se ha publicado que las bajas concentraciones de glucocorticoides (evento que se produce durante la primera etapa de la involución de la glándula mamaria), son capaces de reprimir los genes inducibles por NF- κ B a través de la inhibición de la actividad HAT (Ito et al. 2000).

En conjunto, nuestros resultados sugieren que mientras que a las 48h tras el destete NF- κ B transcripcionalmente inactivo se une de forma heterogénea a elementos *cis* en un gran número de genes, NF- κ B/p300 se une a unos pocos genes principalmente en sitios cercanos al TSS. Es más, dichos genes parecen estar implicados principalmente en procesos inflamatorios y apoptóticos (**Figura 17**). Por el contrario, el análisis de las funciones biológicas de la totalidad de genes que unen p65 indica que estos están preferentemente relacionados con funciones tales como la proliferación, el metabolismo del nitrógeno (que suele estar sobre-representado en procesos de síntesis activa de DNA), la señalización y el desarrollo (**Figura 12**). Por otra parte, dado que este tipo de análisis bioinformático permite la inclusión de un mismo gen en distintas categorías, cabe pensar que la red

transcripcional más relevante de este grupo de genes que unen p65 está relacionada con la proliferación celular.

Con frecuencia, los factores de transcripción permanecen unidos a distintas regiones de un gen como si se tratara de "marcadores de lectura" de un libro. Cada tipo de estímulo especificará el factor o combinación de estos que deberá participar en la respuesta transcripcional de cada gen. Muy probablemente, el papel de NF- κ B sobre la regulación de genes relacionados con la proliferación sea dependiente del control espacio-temporal de dichas redes transcripcionales. De acuerdo con esta idea, se ha descrito en la literatura que NF- κ B presenta dos importantes picos de activación en la glándula mamaria murina durante el ciclo de lactancia: uno durante el período de gestación en el que tiene lugar la proliferación celular y el desarrollo de la glándula y otro durante la fase de involución (Brantley et al. 2000; Geymayer & Doppler, 2000). Se ha demostrado que cuando se inhibe de forma específica la activación de NF- κ B, los ratones no solo presentan un bloqueo de la proliferación lobulo-alveolar durante la gestación, sino que además muestran severas deficiencias en la lactancia, aunque precisamente durante la lactancia la actividad de este factor es indetectable (Cao & Karin, 2003). Por otra parte, la activación constitutiva de NF- κ B en la glándula mamaria lleva al desarrollo tumoral (Romieu-Mourez et al. 2003).

El control espacio-temporal de NF- κ B resultará, por tanto, clave para el *output* final de las redes transcripcionales. En este sentido, es importante destacar que el análisis por categorías patológicas de aquellos genes que unían p65/p300 a las 48h de involución reveló

que el 81% de estos genes estaba incluido dentro de la categoría de neoplasma. De hecho se ha sugerido que la desregulación de la involución post-lactancia puede facilitar la formación de tumores (Radisky & Hartmann, 2009; Schedin et al. 2007). La elevada incidencia de cáncer de mama asociada al embarazo podría estar favorecida por el microambiente inflamatorio que se genera en la mama tras el cese de la lactancia (Lyons et al. 2011). La disponibilidad del listado, que aquí se presenta, de genes diana de NF- κ B durante la involución post-lactancia de la glándula mamaria, supondrá una importante herramienta, no sólo para posteriores estudios experimentales, sino para el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas y marcadores con valor pronóstico.

III.2 Control del *input*: Elementos cooperadores de NF- κ B.

Hasta el momento hemos visto que nuestros resultados podrían sugerir que, aunque p65 puede unirse a múltiples sitios en los promotores de genes o *enhancers*, muy probablemente la accesibilidad de p300 está restringida a algunos genes que unen p65 cerca del TSS. Además, tras un análisis bioinformático exhaustivo, hemos observado otros factores de transcripción en las proximidades de la zona de unión de p65/p300. ETS y KLF son algunos de los factores de transcripción que se unen tanto al grupo de genes que solo unen p65, como a los que unen p65/p300. De acuerdo con estos resultados, se ha descrito una correulación de

algunos genes por p65 y ETS (De Siervi et al. 2009). Notablemente, el 85% de los genes que unen p65/p300 también tienen un sitio de unión para Sp1, que no se encuentra en el grupo de genes que unen solamente p65 (**Tabla IV**). De acuerdo con este modelo, la transcripción de este conjunto de genes podría activarse sinérgicamente por la unión cooperativa de NF- κ B y Sp1 (**Figura 62, modelo 1**). En este sentido, se ha demostrado que se requiere una interacción funcional entre NF- κ B y Sp1 para la expresión completa de determinados genes (Hirano et al. 1998).

Sin embargo, en otros trabajos se ha descrito que la unión conjunta de NF- κ B y Sp1 a los promotores de algunos genes, produce la inhibición de la transcripción del gen diana. Mediante *ChIP assay*, Gallic Beauchef y colaboradores observaron la unión de estos dos factores de transcripción al promotor del gen del procolágeno α 1(I) (COL1A1) de fibroblastos humanos. La inhibición de Sp1 mediante siRNA, bloqueaba el efecto inhibitor de p65 sobre la transcripción de COL1A1 (Beauchef G et al 2012). En el contexto de la glándula mamaria, aunque Sp1 presenta unos niveles elevados a las 24 horas tras el destete, su expresión decae a los 3 y 5 días de la involución (Brantley DM et al 2000). Aunque no se conocen los niveles de Sp1 a las 48 horas tras el destete, punto en el que hemos realizado nuestro análisis, la liberación de Sp1 de la región promotora de los genes diana de p65/p300, podría activar la transcripción de dichos genes (**Figura 62, modelo 2**).

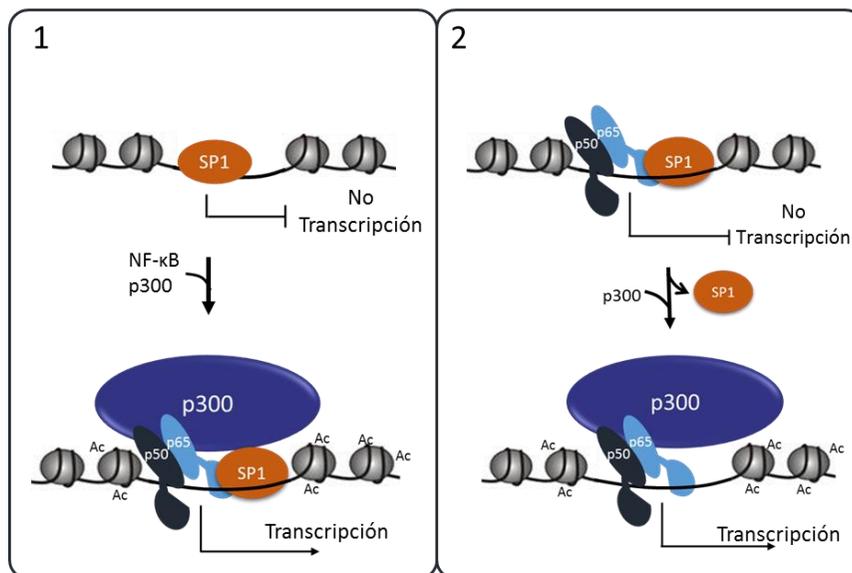


Figura 62: Posibles modelos en los que NF-κB, Sp1 y p300 actúan sinérgicamente en la transcripción de los genes diana para p65/p300 a las 48 horas tras el destete transcripcionales. En el modelo 1 se requiere NF-κB /Sp1 en el promotor del gen para que se reclute p300 y se exprese el gen. En el segundo modelo, la unión conjunta de NF-κB y Sp1 a los promotores, produce la inhibición de la transcripción del gen diana. A las 48 horas tras el destete se produciría la liberación de Sp1, momento en el cual NF-κB podría reclutar p300.

Por otro lado, se ha descrito que las proteínas KLF, pueden reclutar complejos HDAC, reprimiendo la transcripción génica, a través de la interacción directa con Sin3A (Lomberk & Yrrutia, 2005). Por lo tanto, cabe la posibilidad de que los genes que unen sólo p65 podrían estar reprimidos por algún factor transcripcional de la familia KLF, ya que están sobrerrepresentados en este grupo.

En conjunto estos datos ponen de manifiesto la complejidad del sistema de regulación de este grupo de genes modulados por p65/p300. Además, nuestros resultados ponen de relieve la necesidad de un examen más exhaustivo para determinar si la

posible interacción entre KLF, Sp1 y NF- κ B es responsable de la expresión de un grupo de genes concreto que favorezca un proceso biológico en particular en la glándula mamaria a las 48 h de la involución.

III.3 Análisis del programa funcional. Output final o secundario.

Las técnicas genómicas de obtención masiva de datos requieren un análisis bioinformático que permite agrupar genes en categorías funcionales o moleculares. La información que se obtiene describe cambios globales o establece perfiles de expresión, pero no proporciona detalles de los procesos biológicos y las redes de señalización implicadas en la propagación y resolución de la respuesta.

Entre los genes diana de NF- κ B transcripcionalmente activos a las 48h tras el destete forzado, encontramos los genes que codifican la calpaína 1 y 2 (**Figura 20**). Estas cisteín proteasas calcio dependientes están implicadas en varios procesos fisiológicos como la organización del citoesqueleto, la señalización celular, la apoptosis o la supervivencia celular. Además, se ha descrito alteraciones en la expresión de las calpains durante la tumorigénesis (Leloup & Wells, 2011; Storr et al. 2011).

Los resultados de este trabajo demuestran que tanto los niveles de mRNA, como los niveles de proteína de la Capn 1 y 2, se ven incrementados tras el destete (**Figuras 21 y 22**). También

hemos observado un incremento de la de la expresión de la subunidad reguladora (Capn4) (**Figura 22a**).

Para que las calpaínas se activen debe haber un aumento de la concentración de calcio intracelular. Al final de la lactancia hay un aumento sustancial de los niveles de calcio, que podría ser debido, no sólo a la estasis de la leche dentro del lumen alveolar, sino también a la marcada disminución de los niveles de uno de los transportadores de calcio principales, PMCA2 (Reinhardt & Lippolis, 2009; VanHouten et al. 2010) (**Figuras 26 y 27**). El incremento de Ca^{2+} observado a las 24 horas tras el destete coincide con el aumento de la actividad calpaína debido a la autólisis del extremo amino-terminal de ambas proteasas (**Figuras 23 y 24**).

Puesto que las calpaínas requieren unos niveles de Ca^{2+} muy elevados, el hecho de localizar la Capn 1 cerca de la parte apical de las células epiteliales podría facilitar la activación de esta, ya que es donde se encuentran las bombas de Ca^{2+} , PMCA2 (**Figura 25**) (Faddy et al. 2008). Por consiguiente, cuando este transportador disminuye, se acumularía el calcio intracelular, principalmente en la zona apical, y las calpaínas se activarían. Por otra parte, mediante inmunofluorescencia, comprobamos que durante la lactancia, la Capn 2 se localiza preferentemente junto a la membrana plasmática, concretamente en la región baso-lateral de las células epiteliales (**Figura 25**). En esta zona se localizan los canales de calcio Orai1 que participan en el flujo de calcio al interior de la célula epitelial, y cuya expresión se mantiene alta durante la involución de la glándula mamaria (Cross et al. 2013).

Como se ha comentado anteriormente, los genes diana de p65/p300 parecen estar implicados principalmente en procesos relacionados con la inflamación y la apoptosis durante la involución de la glándula mamaria (**Figura 17**). En este sentido, las calpaínas se han descrito como unos mediadores clave de la muerte celular programada en varios modelos experimentales (Tofighi et al. 2011; Nozaki et al. 2011; Liu et al. 2009). Recientemente en nuestro laboratorio hemos descrito el importante papel que desempeñan estas proteasas en la desestabilización de la membrana lisosomal y mitocondrial, favoreciendo la muerte celular programada de las células epiteliales secretoras de la glándula mamaria tras el destete (Arnandis et al. 2012). Además hemos descrito que la calpaínas se traslocan a la membrana nuclear, produciendo una proteólisis parcial de diferentes nucleoporinas y, por lo tanto, una pérdida de la selectividad del transporte nuclear en estas células (Arnandis et al. 2014).

Uno de los primeros eventos que ocurre en la muerte de las células epiteliales durante la involución de la glándula mamaria, incluso antes de la condensación citoplasmática y nuclear, es la pérdida de contactos desmosomales entre las células epiteliales (Tenniswood et al. 1992, Potter et al. 1996). Se han descrito diferentes proteínas de adhesión celular como dianas de las calpaínas (Carragher & Frame, 2002; Franco & Huttenlocher, 2005; Bate et al. 2012), por lo que nos propusimos estudiar si las calpaínas estaban implicadas en el desprendimiento de las células epiteliales mamarias hacia el interior del lumen acinar.

En este trabajo hemos demostrado que varias proteínas relacionadas con la adhesión celular, como la E-Cdh, talina 1, β -cat y p120 disminuyen sus niveles como consecuencia de una degradación proteolítica durante la involución (**Figura 29**). Estos resultados están de acuerdo con las observaciones de Christopher J. Vallorosi y colaboradores (2000) en las que se describe que la proteína de adhesión E-Cdh, se degradaba durante el destete, produciéndose una escisión del dominio de unión a β -Cat y a p120. Además, previo al proceso de apoptosis, los mismos autores observaron la aparición de un fragmento de aproximadamente 97 KDa de la E-Cdh (Vallorosi et al. 2000).

Ambas calpaínas parecen responsables de la fragmentación específica de E-Cdh, β -Cat, p120 y talina 1 *in vitro* (**Figuras 30 y 31**). La proteólisis de estas proteínas podría tener diferentes consecuencias en el contexto de la glándula mamaria:

- *E-Caderina*. En consonancia con nuestros resultados, en células de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) se identificó a las calpaínas como responsables de la escisión de la E-Cdh *in vitro*, generando un fragmento de 100 KDa (Rios-Doria et al. 2003). Probablemente, la E-Cdh se fragmente por uno de los dominios citosólicos, es decir, en el extremo carboxi terminal de la proteína madura de 120 KDa. De hecho se ha propuesto que la calpaína induce la escisión proteolítica dentro del dominio citoplásmico de la E-Cdh en células de próstata y en células epiteliales

mamarias (Rios-Doria et al. 2003). El dominio citoplasmático de la E-Cdh truncado, incapacitaría a esta proteína transmembrana para unirse a β -Cat, a γ -catenina y a p120, proteínas esenciales en la estabilización del complejo de adhesión formado por la E-Cdh. Además, estas proteínas participan en la señalización celular (Yap et al. 1997). La escisión de la E-Cdh produciría un cambio en la conformación de la proteína cerca del dominio yuxtamembrana y, por lo tanto, la pérdida del sitio de unión de p120 (Thoreson et al. 2000).

- *β -catenina y catenina p120*. Ambas proteínas también son proteolizadas *in vitro* por la calpaína 1 y 2. Anteriormente, ya se describió que p120 era degradada por las calpaínas después de las 36 horas de isquemia. Por lo que se refiere a β -Cat, Schneider C. y colaboradores (2005) describieron que el sistema calpaína parecía estar mediando los niveles de β -Cat, principal mensajero de la vía de señalización de Wnt, en células luminales secretoras (Heuberger & Birchmeier, 2010). Aunque no llegaron a identificar de qué calpaína se trataba, la disminución de la subunidad reguladora de la calpaína con siRNA resultó en un aumento significativo de los niveles de β -Cat en el núcleo, así como de su actividad transcripcional en células de osteosarcoma (U2OS) y de cáncer de pulmón (H1299) (Benetti et al 2005). Por lo tanto, tras la liberación del complejo de la E-Cdh, las calpaínas podrían proteolizar β -Cat, impidiendo de ese modo su

entrada al núcleo y su actividad transcripcional sobre genes de proliferación celular y supervivencia.

- Talina 1. La adhesión de las células a la matriz extracelular está mediada por las integrinas, las cuales, a su vez, están relacionadas con el citoesqueleto a través de diferentes proteínas del complejo de adhesión focal (Yamada & Miyamoto, 1995). Aquí, hemos demostrado que Talina 1, también se proteoliza específicamente por las calpaínas *in vitro* (**Figuras 30 y 31**). En este sentido, ya se ha descrito el importante papel de las calpaínas, no solo en la proteólisis de Talina 1, sino también de otras proteínas importantes en la adhesión mediada por integrinas como la quinasa de adhesión focal (FAK). Mediante el uso de siRNA de las calpaínas, se ha observado una disminución de la proteólisis de ambas proteínas en fibroblastos NIH 3T3 (Franco et al. 2004; Chan et al. 2010). Además, la fosforilación de la calpaína 2 en la Ser50 por ERK estimula la actividad de la calpaína 2 en ausencia de concentraciones milimolares de Ca^{2+} . La substitución de esta serina por una alanina inhibe la migración celular en fibroblastos murinos NR6 (Glading et al. 2004; Cuevas et al. 2003). Por lo tanto, la inhibición farmacológica de ERK o de las calpaínas podría disminuir la migración celular que tiene lugar en la metástasis.

En conjunto, los datos en la literatura y los obtenidos en este estudio sugieren que las calpaínas podrían participar en la desestabilización de las uniones adherentes, actuando sobre diferentes miembros de este complejo (E-Cdh, β -Cat y p120), y también estarían involucradas en la desestabilización de las uniones mediadas por integrinas, actuando sobre talina 1. Todo ello explicaría el hecho de que las células que han entrado en un proceso de apoptosis, se desprenden desde el epitelio glandular hacia el lumen alveolar durante la involución de la glándula mamaria (**Figura 63**).

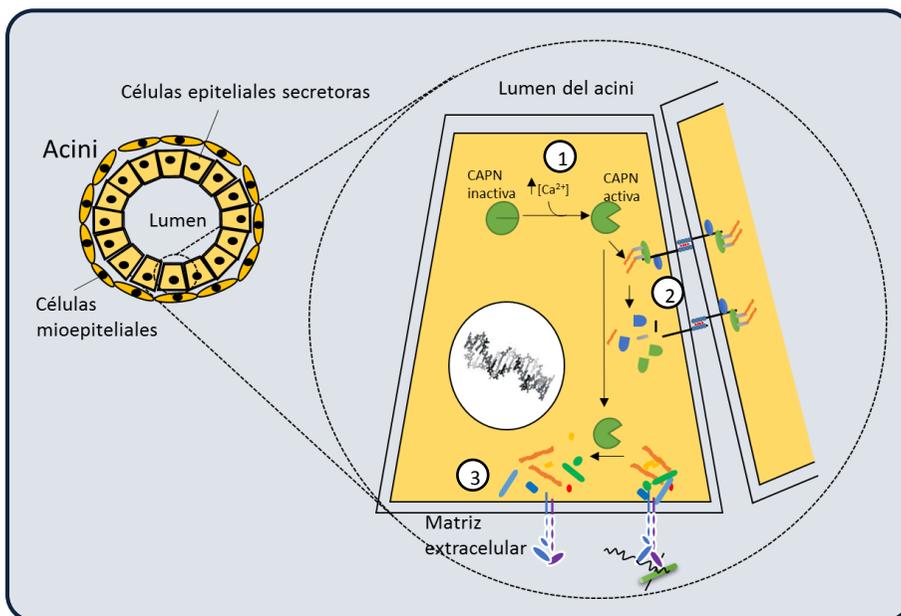


Figura 63: Esquema representativo del papel de las calpaínas en la desestabilización de los complejos de adhesión celular durante el destete. Durante la lactancia, se activan las calpaínas (1). Las calpaínas activas fragmentan a las proteínas integrantes de los complejos de adhesión célula-célula (2) y célula-matriz (3), favoreciendo su desprendimiento al lumen acinar durante la involución de la glándula mamaria.

IV. Id2 como nodo de regulación de redes transcripcionales en el hígado.

Las técnicas de obtención masiva de datos basadas en ChIPs han mostrado que los factores de transcripción se pueden unir a miles de fragmentos genómicos en distintos modelos experimentales, sugiriéndose que estos factores podrían estar interaccionando de forma indirecta con el DNA o que su unión requiere de la presencia de factores de cooperación adicionales. Hasta la fecha, la mayor parte de los estudios descritos en la literatura han tratado de analizar el papel de un determinado factor de transcripción sobre el *output* de redes transcripcionales en un contexto concreto, así como las secuencias de unión de dicho factor asociadas a genes codificantes a lo largo de todo el genoma de un organismo. Id2, catalogado inicialmente como factor de transcripción, es una de esas proteínas que interacciona con el DNA de forma indirecta (Rodríguez et al. 2006; Torres et al. 2009).

IV.1 Análisis genómico y *output* inicial o primario.

Los experimentos de ChIP/chip realizados en este trabajo muestran que Id2 se une a un subconjunto de 442 genes modulados por E2F4. Por otro lado, también se encontró un conjunto de genes a los que se une sólo Id2 (33% del total de los genes a los que se une Id2) (**Figura 36**). Este resultado podría

sugerir que Id2, aunque preferentemente se une a un complejo que contiene E2F4, no requiere necesariamente a E2F4 para unirse a complejos proteicos en los promotores génicos. Sin embargo, teniendo en cuenta que, con el fin de evitar falsos positivos, se realizó un análisis muy restrictivo, no podemos descartar la posibilidad de que este pequeño porcentaje de genes que unen Id2 también podrían asociarse a E2F4. Anteriormente se había demostrado que Id2, junto con E2F4, se unía a un complejo represor en el promotor de *c-myc* afectando a la estructura de la cromatina (Rodríguez et al. 2006). Sin embargo, hemos propuesto por primera vez que Id2 es parte de un mecanismo más general de la regulación de la transcripción de lo que se pensaba en un principio.

Los datos de la comparación entre la localización más frecuente de E2F4 (-35pb del TSS) con la de los genes diana de Id2/E2F4 (+125pb del TSS), sugieren que existe una estructura común en estos genes modulados por E2F4/Id2 diferente de los genes que sólo unen E2F4 (**Figura 38b**). Además, se observa un perfil de unión de Id2 más amplio, lo que podría reflejar el posicionamiento de un complejo de proteínas más grande al que Id2 podría asociarse, ya que Id2 carece de un dominio de unión a DNA. Esta idea está de acuerdo con nuestro análisis de localización de los factores realizado en todo el genoma donde se vió que la longitud promedio de las regiones cubiertas por Id2 o E2F4/Id2 es mucho mayor (con una media de 277pb) que la de las regiones cubiertas sólo por E2F4 (24pb). Destacar que, tanto el complejo E2F4/Id2 como Id2 por sí solo, cubren la misma longitud y se

posicionan a la misma distancia respecto al TSS. Lo más probable es que, debido al análisis estadístico antes mencionado, se subestimara el número real de genes diana para el complejo E2F4/Id2. Muy probablemente, todos los genes que unen Id2 también unen E2F4.

En el tejido hepático diferenciado, cuando los niveles de Id2 son bajos, este se une a una selección de genes modulados por E2F4 relacionados principalmente con el desarrollo celular y con la remodelación de la cromatina (**Figura 43**). Aunque no podemos negar el papel indiscutible de Id2 como un factor de proliferación, como hemos mencionado en la introducción, ya se ha descrito su importante papel en la diferenciación y el desarrollo de varios tejidos (Yokota, 2001; Ikawa et al. 2001; Mori et al. 2000; Klose et al. 2014). Sin embargo, hasta la fecha no se había implicado a Id2 en el desarrollo hepático. Además, hemos observado que, mientras estos genes se encuentran transcripcionalmente inactivos en el hígado adulto, se están transcribiendo de forma activa durante el desarrollo hepático (**Figuras 46 y 48**). Por lo tanto, los datos obtenidos sugieren que en hígado adulto, E2F4/Id2 podría ser parte de un complejo de pausa en un subconjunto de genes que juegan un papel importante durante el desarrollo del hígado.

IV.2 Control del *Input*: Regulación de los niveles de Id2 y módulos de cooperación.

Se ha propuesto que el umbral de concentración de Id2 es crucial para su función como una proteína pleiotrópica (Ruzinova & Benezra, 2003; Lasorella et al. 2001; Coma et al. 2010; Norton & Atherton, 1998). El control transcripcional de Id2 es un proceso clave en la modulación de su concentración en la célula, y por lo tanto de su función. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre la expresión de Id2 en hígado fetal e hígado adulto (**Figura 49**), pero sí a nivel de proteína (**Figura 50a**). Esto se podría explicar porque la proteína Id2 se somete a un recambio rápido mediante poliubiquitinación y degradación proteasomal, que hace que su vida media varíe en función del tipo celular (Deed et al. 1996; Bounpheng et al. 1999). Recientemente, se ha descrito el mecanismo molecular implicado en la modulación de los niveles de la proteína Id2, en las cuales USP1 participaría en el reconocimiento, deubiquitinación y estabilización de Id2 (Williams et al. 2011). Además esta deubiquitinasa tiene un papel importante durante el desarrollo embrionario, donde se ha observado una mortalidad perinatal elevada en ratones KO para esta proteína (Kim et al. 2009). A pesar que en nuestros experimentos no se ha demostrado directamente, los ensayos de co-inmunoprecipitación sugieren que USP1 estabiliza Id2 (**Figura 50b**). La actividad deubiquitinasa de USP1 no es la única función reconocida para esta proteína. Se conoce que USP1 contiene dos señales de localización nuclear (NLS1 y NLS2) que median tanto su propio transporte al

núcleo, como el de las proteínas con las que interacciona (García-Santisteban et al. 2012). Por lo tanto, podríamos pensar que USP1 podría participar en el transporte de Id2 al interior del compartimento nuclear, ya que Id2 no posee ninguna NLS y su translocación desde el compartimento citosólico al núcleo debe estar mediada por la interacción con una proteína que contenga una NLS. A pesar de todas estas evidencias, no se conoce con exactitud el papel que desempeña USP1 en la estabilidad de Id2 o su transporte durante el desarrollo del hígado, por lo que aún debe estudiarse más a fondo.

Además, hemos observado que los niveles Id2 disminuyen en el tejido diferenciado, y su localización está restringida al núcleo (**Figuras 50 y 53**), donde se encuentra unido a un complejo de proteínas junto con E2F4 y Pol II en los promotores de unos genes determinados (**Figuras 47, 56, 57 y 60**). Aunque no pudimos encontrar un módulo de unión para un factor de transcripción que diferenciase los genes que solamente unen E2F4 de los genes diana para el complejo E2F4/Id2, se encontraron claras diferencias en el sitio de unión para E2FF. Concretamente se observó que E2F4 presenta varios sitios de unión en la región *downstream* del TSS, solapando con el primer exón, en todos los genes E2F4/Id2. Sin embargo, en aquellos genes en los que no se encontró Id2 en sus promotores, E2F4 se localizó en una posición *upstream* del TSS. Por lo tanto, esto podría sugerir que la localización del factor transcripcional E2F4 influye en la presencia o no de Id2 en un determinado gen.

Por otro lado, se observó que Id2 y Pol II estaban unidos a una región con un alto contenido de GC en el tejido hepático diferenciado (**Figura 54**). Se ha demostrado que el contenido de GCs es mayor en los promotores de genes cuya activación es independiente de remodelación y por lo tanto están preparados para la transcripción. En células estimuladas de médula ósea, la mayoría de promotores presentan una Pol II pre-ensamblada (Ramirez-Carrozzi et al. 2009). Por lo tanto, estos datos podrían sugerir que E2F4/Id2 están unidos a un conjunto de genes que se caracterizan por una estructura de la cromatina constitutivamente activa.

Aunque, por un lado se ha predicho que los promotores con un elevado contenido en GC no son compatibles con el ensamblaje nucleosomal (Segal et al. 2006), por otro lado, otros autores informan de que un alto contenido en GC favorece termodinámicamente el montaje de un nucleosoma (Ramirez-Carrozzi et al. 2009). Concretamente, nosotros hemos observado que, cuando los genes están siendo transcripcionalmente activos en hígado fetal y durante la regeneración hepática (**Figuras 48 y 58**), se produce un reposicionamiento nucleosomal en la región downstream del TSS (**Figuras 56 y 60**). Este comportamiento es característico de aquellos genes con una Pol II pausada en sus promotores. Tras la estimulación de los genes diana, la Pol II pausada se libera del promotor de los genes y los nucleosomas se vuelven a ensamblar en esta región (Gilchrist & Adelman, 2012). Por lo tanto, nuestras observaciones estarían de acuerdo con la hipótesis de que un alto contenido de GC favorece la ocupación

nucleosomal en el lugar previamente ocupado por la Pol II (Ramirez-Carrozzi et al. 2009).

IV.3 Análisis del programa funcional. Output final o secundario.

Hasta el momento, se ha sugerido que la competencia entre la unión de Pol II y un nucleosoma a los promotores génicos podría ser un mecanismo de modulación importante en la inducción de la transcripción de los genes con Pol II en sus promotores (Gilchrist & Adelman, 2012). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que Id2 podría estar implicado en el pausado de la Pol II en genes específicos. Además, puesto que se ha propuesto que los genes que contienen una Pol II pausada en su promotor son los primeros en responder ante un determinado estímulo (Hargreaves et al. 2009), Id2 podría estar implicado en la sensibilización de los genes diana frente a estímulos específicos, manteniendo a estos genes en un estado de pausado. Mencionar que el posicionamiento de un nucleosoma en la región que une el complejo E2F4/Id2 no significa que se reprima la transcripción de estos genes, sino que dependerá de las modificaciones postraduccionales de los extremos aminoterminales de las histonas, y por lo tanto, de la fuerza con la que este nucleosoma se une al DNA.

Por otro lado, hemos observado que tras la PHx, al inicio de la regeneración hepática, Id2 deja de estar unido a los promotores de los genes diana y Pol II se libera, aumentando la expresión de

dichos genes (**Figuras 57, 58 y 60**). En general, la unión de Id2 a los promotores de un subconjunto de los genes modulados por E2F4, parece ser parte de un programa reversible relacionado con el desarrollo. Apoyando esta idea, se ha descrito que los genes que codifican proteínas que participan en la regulación de procesos relacionados con el desarrollo, presentan una Pol II pausada en sus promotores. En células diferenciadas estos genes activarían el inicio de la transcripción, pero no serían capaces de continuar con la elongación (Guenther et al. 2007).

Algunos de los genes que hemos estudiado como diana del complejo E2F4/Id2 son Jmjd6, una desmetilasa de histonas, y Suv39h2, una histona metiltransferasa (**Figuras 47 y 57**). Se ha descrito que estos genes participan en la reorganización de la cromatina en procesos de diferenciación durante la embriogénesis (Lee et al. 2012b; Peters et al. 2001). Recientemente se ha descrito que Jmjd6, junto con la proteína de bromodominio Brd4, interactúa con el complejo P-TEFb para regular la salida del pausado de Pol II en un gran número de genes (Liu W et al 2013). Por lo tanto, podríamos pensar que tras un determinado estímulo, se produciría la liberación de Id2 de los promotores de estos genes de expresión temprana y, por lo tanto, el avance de la Pol II (**Figura 63 modelo 1**). Esto produciría un aumento de los niveles de estas proteínas remodeladoras de la cromatina, que en última instancia favorecerían la expresión de otros genes de expresión tardía. Todo esto iría a favor de la hipótesis de que Id2 formaría parte del proceso de *priming* o sensibilización, permitiendo a las células hepáticas entrar en procesos de proliferación y diferenciación.

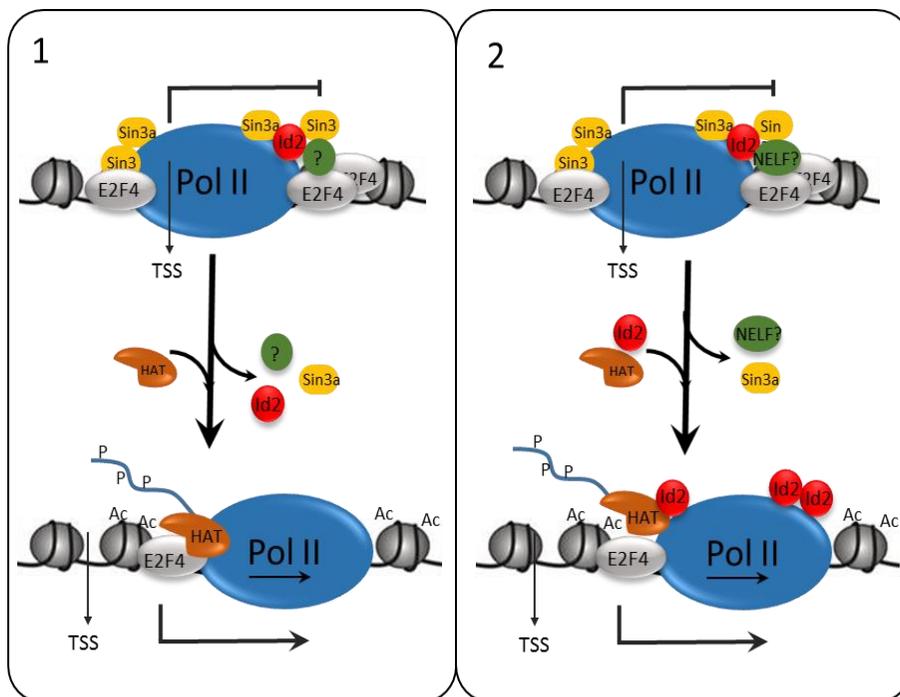


Figura 63. Modelos hipotéticos para el papel de *Id2* sobre la expresión de los genes diana *E2F4/Id2*. En condiciones basales los hepatocitos se encuentran en estado de quiescencia o GO. En el modelo 1, *E2F4*, *Id2* y otras proteínas forman un complejo que favorece el pausado de la *Pol II* en la región promotora. Por lo tanto no se produce la transcripción génica. Tras un determinado estímulo mitogénico, durante el desarrollo hepático o tras la PHx, se produce la liberación de *Id2* de los promotores diana. Esto permite el avance de la *Pol II* y un reposicionamiento nucleosomal, produciéndose la transcripción de genes de expresión temprana. En el modelo 2, tras un estímulo mitogénico, cambia la estequiometría entre factores de pausa y de elongación. En este modelo *Id2* actuaría como un factor de elongación.

Aun con todas las evidencias observadas hasta el momento, cabe la posibilidad de que *Id2* pudiera actuar como un factor de elongación, compitiendo con los factores de pausado por la unión a *Pol II*. Por lo que, la expresión del gen diana vendría determinada por la concentración estequiométrica de *Id2* y los factores de pausa (Figura 63 modelo 2). Sin embargo, no hemos conseguido co-

inmunoprecipitar Id2 con la forma fosforilada de elongación de Pol II (datos no mostrados). Por lo tanto, para aclarar el posible papel de Id2 en el pausado de Pol II en los genes modulados por E2F4/Id2, se podría estudiar la interacción de otros factores de pausado conocidos como NELF y DSIF (Yamaguchi et al. 2013).

Por otra parte, muchos de los programas transcripcionales inducidos durante el desarrollo hepático, también se han descrito en carcinoma hepatocelular (Coulouarn et al. 2005, Li et al. 2010). Por lo tanto, la desregulación de Id2 en la modulación del pausado de estos genes diana, podría estar implicado en la progresión tumoral. De hecho, hemos observado que hay un mayor porcentaje de genes que unen el complejo E2F4/Id2 relacionados con el cáncer, en comparación con los que sólo unen E2F4 (**Figura 61**). Por este motivo, es necesario seguir profundizando en este mecanismo de regulación de la expresión génica.

CONCLUSIONES

En el presente proyecto de tesis se ha contribuido a elucidar el importante papel que ejercen los nodos de regulación transcripcional en un contexto fisiológico en el que tienen lugar diferentes procesos biológicos de forma simultánea y coordinada. Concretamente, se ha estudiado cómo dos *inputs* primarios, NF- κ B e Id2, desencadenan un determinado *output* o proceso biológico concreto en la glándula mamaria y el hígado. La alteración de estos nodos de regulación transcripcional podría traducirse en la aparición de cáncer. Las conclusiones específicas de este proyecto de tesis son las siguientes:

1. NF- κ B tiene un papel importante como nodo de regulación transcripcional durante el proceso de la involución de la glándula mamaria tras el ciclo embarazo/lactancia. Se han identificado 268 genes diana implicados principalmente en procesos de inflamación y apoptosis. Dos de estos genes son la calpaína 1 y la calpaína 2. Ambas calpaínas participan como uno de los *output* de este nodo de regulación transcripcional, desestabilizando las uniones intercelulares y favoreciendo el desprendimiento de las células epiteliales al lumen acinar.
2. Id2 forma parte de un mecanismo general de regulación de la expresión génica en el hígado. E2F4/Id2 se une a una secuencia común en 440 genes, implicados, principalmente en el desarrollo embrionario y la remodelación de la cromatina, a través de un posible mecanismo de modulación del pausado de poll II. Por lo tanto, el *output* final de este nodo de regulación sería el desarrollo hepático y la diferenciación del tejido.

- 3.** El análisis bioinformática indica que tanto NF- κ B como Id2 tienen un destacado papel en el cáncer. El 81% de todos los genes diana de NF- κ B, están implicados en el cáncer de mama. Por otro lado, hay un mayor porcentaje de genes diana del complejo E2F4/Id2 relacionados con el cáncer que aquellos que no unen Id2.

ABSTRACT

NF- κ B and Id2 as nodes of transcriptional regulatory networks in different biological models.

I. Introduction.

For decades, the study of gene transcription regulation has been one of the largest challenges in Molecular Biology. Determining the factors or elements that control the precise pattern of gene expression for each cell type, or in other words, deciphering the mechanisms of modulation that allow a given gene to be expressed in the right place, the right time and at the right level remains today a key point to understand cell behavior. Nowadays biologists try to combine information of multiple regulatory levels to gain a new integrated understanding that incorporates the complexity that characterizes biological systems.

The application of DNA microarrays to study this issue, has revealed the existence of groups of genes with similar expression patterns within a biological process. However, gene cluster analyses provide little insight into the relationships among groups of co-regulated genes. In addition, most of times there is no information about the biological processes and signaling networks involved in propagation and resolution of a given response to a physiological stimulus.

Therefore, we should talk about gene networks rather than master genes when we try to understand a functional gene expression

program. From this point of view, transcription factors have been considered as transcriptional regulatory nodes for specific functional programs. The study of transcription factor-binding to a functionally related subset of genes will further contribute to understand this multigenic program.

Overlapping biological processes can be triggered simultaneously. Although the molecular mechanisms involved in the inclination to a particular biological process remain elusive, it is not unusual to find common regulatory proteins for the above mentioned processes. Such is the case for transcription factors NF- κ B or Id2, which play an important role in inflammation, cell survival, proliferation, development and oncogenesis (Baud & Karim, 2009; Norton, 2000).

However, the study of transcriptional regulatory nodes constituted by pleiotropic transcription factors such as NF- κ B or Id2 are extremely complicated. The modulation of the proteins levels, subcellular localization and activity of these proteins is under tight control, restricted to a very precise and coordinated with the expression of other proteins with which they can interact. In other words, they depend on the cellular microenvironment and therefore, the selection of the experimental model in which these regulatory nodes will be studied is not a trivial matter.

Two models where different and overlapping processes are finely turned by coordinated signals are the mammary gland involution after lactation and the liver, an organ characterized by its tremendous plasticity and its versatility of stimulus-induced responses.

Indeed, following lactation and the weaning of the pups, the mammary gland undergoes a sequential chain of events known as

involution which ends up with the gland returning to a pre-pregnant like state. Mammary gland involution goes through two coordinated stages: while the first stage involves alveolar programmed cell death, the second one is characterized by lobular-alveolar remodeling of the gland and adipogenesis (Lund et al. 1996). Each of these stages exhibit prototypical changes in gene expression and protein activity. Nonetheless, some of the regulatory signals triggered during the first onset of mammary gland involution persist throughout the whole process (Wiesen & Werb, 2000).

On the other hand, the challenges of the liver to maintain homeostasis are preserved by complex but unflinching responses involving coordination of signaling pathways, cell growth, apoptosis, inflammation or differentiation in different hepatic cell types (Michalopoulos, 2013). This capacity of liver to integrate apparently opposing signals within a tissue makes this organ a relevant model to study the regulatory nodes involved in a functional multigenic program.

NF- κ B as a node of transcriptional regulation during mammary gland involution.

A deeper study into the molecular mechanisms involved in the regulation of mammary gland involution revealed different biological processes overlapping at the same time. The transcription factor NF- κ B regulates a diversity of biological processes such as immune response, inflammation, proliferation, apoptosis or cell differentiation (Skaug et al. 2009).

Among this family of transcription factors, two NF- κ B sub-units, RelA (p65) and p50 are expressed at different levels in the mammary epithelium throughout mammary gland development, with two major peaks of activation, during pregnancy and involution (Brantley et al. 2000). In fact, overlapping with a deluge of pro-inflammatory signals, increased NF- κ B activity can be detected as soon as 1h after weaning (Clarkson et al. 2000), and it remains activated at 3 days after removal of the pups (Brantley et al. 2000). This pattern of NF- κ B activity seems to be critical for mammary gland development and involution. It has been shown that defective activation of NF- κ B in IKK α knockin mice displays impaired proliferation of the lobuloalveolar tree during pregnancy (Cao et al. 2001). More importantly, when uncoupled from its physiological mode of regulation, constitutive activation of NF- κ B in c-Rel transgenic mice leads to tumor development (Romieu-Mourez et al. 2003). Nevertheless, although most reports associate NF- κ B activation with survival pathways (Clarkson et al. 2000; Fan Y et al. 2008), this transcription factor has also been shown to modulate the induction of pro-apoptotic genes. Indeed, defective NF- κ B signaling in conditional IKK β knockout mice abrogated caspase-3 activity during involution and delayed apoptosis and remodeling of the gland (Connelly et al. 2010).

Consistent with these data, it has been suggested that NF- κ B may play a major role as a checkpoint regulator in the mammary gland after weaning. Identification of NF- κ B-regulated genes in vivo will help our understanding of the complex interplay between opposite signals.

Id2 as a node of transcriptional regulation in liver.

The inhibitor of differentiation Id2 is a HLH protein that lacks the basic region essential for specific binding to E boxes on DNA (Murre, 1989). It can dimerize with either class-I or -II proteins, inhibiting their DNA binding activity in a dominant-negative fashion (Benezra et al. 1990). Id2 is a pleiotropic protein involved in the modulation of a variety of biological processes such as cell differentiation, cell proliferation, cell cycle control, senescence, apoptosis or angiogenesis and metastasis (Ruzinova & Benezra, 2003; Lasorella et al. 2001; Coma et al. 2010).

The role of Id2 as a proliferative factor is now recognized as one of the most significant. Indeed, ectopic over-expression of Id2 in different cell types enhances cell proliferation (Lasorella et al. 2001; Norton & Atherton, 1998). However, although deregulated expression of Id2 maintains a highly proliferative state, this is not sufficient for cell transformation (Ruzinova & Benezra, 2003). Id2 was thought to control cell proliferation by repressing the expression of cell cycle inhibitors such as p21^{Cip1} or p57^{Kip2} that are modulated by bHLH factors (Lasorella et al. 2001; Matsumura et al. 2002; Rothschild et al. 2006). Nevertheless, Id2 activity and function can also be dependent on its concentration, dimerization with non-bHLH proteins, or post-translational modifications and sub-cellular distribution (Lasorella et al. 2001; Matsumura et al. 2002; Rodriguez et al. 2006; Williams et al. 2011; Wang et al. 2001; Bounpheng et al. 1999). Independently on the cell type or mitogenic stimulus, increased Id2 levels and nuclear translocation are key events for Id2 function.

In general, Id2 expression is high in undifferentiated proliferating cells, and low or almost absent in non-proliferating cells such as terminally differentiated cells (Chen et al. 2012). On the other hand, Id2 is subjected to polyubiquitination and subsequent protein degradation by the proteasome (Bounpheng et al. 1999). It has been recently shown that USP1 de-ubiquitinating enzyme directly binds to and stabilizes Id2 in osteosarcoma cells inhibiting cell differentiation and promoting proliferation (Williams et al. 2011).

Once into the nucleus, the mechanisms by which Id2 modulates cell proliferation are poorly understood. We have previously shown in experimental models of liver regeneration the putative role played by Id2 as part of a repressor complex on c-myc promoter. On quiescent hepatocytes a complex containing Id2/mSin3A (HDAC)/ E2F4 /p130 remains bound to the c-myc promoter while the gene is repressed (Rodriguez et al. 2006, Torres et al. 2009). It has been postulated that E2F4 and retinoblastoma-binding protein 2 (RBP2) recruit Sin3 to cell-cycle genes during cell differentiation (van Oevelen et al. 2008). Id2 could be part of that differentiation program to establish permanent silencing of E2F4 target genes.

On the other hand, it has been suggested a model in which E2F4/pocket proteins periodically and reversibly recruit Sin3 to gene promoters during cell-cycle progression (Rayman et al. 2002, Balciunaite et al. 2005). In agreement with this, upon mitogenic stimulation by partial hepatectomy (PHx), Id2 and mSin3A are released from the c-myc promoter, inducing a short c-myc up-regulation (Rodriguez et al. 2006). Interestingly, c-myc transcriptional initiation increases soon after PHx in mice liver, but it is compensated by a

concomitant block of transcriptional elongation (Morello et al. 1990). The puzzling observation that both pausing and transcriptional initiation of c-myc are enhanced in the regenerating liver lead to hypothesize that increased transcriptional initiation of c-myc in this growth process might be driven by a component of a more general response. Several genes that share target sequences could be simultaneously activated by a common mechanism, but only additional and specific factors (i.e. transcription or elongation factors) will render the final pattern of gene expression (Morello et al. 1990).

II. Aims

The global aim of this research is to analyze the role of NF- κ B and Id2 as transcriptional regulatory nodes for a functional program within a physiological context where several biological, molecular and cellular processes occur in a simultaneous and coordinated manner.

In order to understand the complex mechanisms whereby NF- κ B regulates the transcription of target genes, the role of this transcription factor as a node of regulation during involution of the mammary gland will be studied. For this purpose the following objectives were set:

1. Identification of NF- κ B-target genes during involution of mammary gland by CHIP/chip experiments.

1.1. Identification and analysis of NF- κ B-binding sites on gene promoters. Selection of target genes for transcriptionally active NF- κ B by p65/p300 CHIP/chips.

1.2. Validation of CHIP/chip data.

1.3. Bioinformatic analysis of p300/p65 target genes.

2. p65/p300-target genes in the propagation and resolution of signals during mammary gland involution.

2.1. Elucidation of the functional program driven by NF- κ B on selected genes during programmed cell death after weaning.

Most of the data about the role of Id2 are in reference to tumors or culture cell lines, which reflect a situation that is far from the physiological conditions. We have previously observed that Id2, along with E2F4, is part of a repressor complex on the *c-myc* promoter, affecting chromatin structure (Rodriguez et al. 2006). These data made us wonder whether Id2 could play a role as part of a common mechanism for transcription initiation/pausing of E2F-driven genes as it has been shown for *c-myc*. Therefore, in order to determine whether the protein Id2 has a general role in transcriptional regulation of E2F4-target genes, the following objectives were set in mouse liver:

1. Analysis of Id2 binding to E2F4-target genes by CHIP/chip experiments in adult mouse liver.

- 1.1. Determination of Id2-binding sites on E2F4-target promoters.
- 1.2. Bioinformatic analysis of molecular and biological functions of E2F4/Id2-target genes. Enriched biological process for E2F4/Id2-target genes and selection of the experimental model.
- 1.3. Role of Id2 in the specific biological process found to be enriched in the previous analysis
- 1.4. Validation of CHIP/chip data in mouse liver. Study of Id2 binding dynamics to selected genes and correlation with the expression profile of selected targets
- 1.5. Modulation of Id2 levels in the selected experimental model.

III. Results and discussion.

III.1. NF- κ B as node of transcriptional regulation during mammary gland involution.

In order to understand the role of NF- κ B in mammary gland involution, a genome-wide analysis of regions bound by p65 was performed in mammary gland at 48h after weaning, the time point of maximal NF- κ B activity. 4532 p65-target genes were identified. Among total p65-enriched genes, only 268 bound the trans-activating complex p65/p300 (**Figure 15**). Our results suggest that the latter represents a major complex preferentially involved in the modulation of the inflammatory response and cell death at 48h of mammary gland involution (**Figure 17**). A genome-wide factor location analysis revealed that p65-binding had a heterogeneous distribution while the complex of p65 and its coactivator p300 were mainly bound to proximal promoters near transcription start sites (**Figures 18 & 19**). Moreover, our computational analysis predicts the existence of cooperating elements on p65/p300-enriched genes that could explain preferential binding of NF κ B to pro-inflammatory and apoptotic genes during mammary gland involution (**Table IV**).

Calpain 1 and Calpain 2 were identified among the p65/p300 target genes related to apoptosis (**Figure 20**). Expression levels of both calpains were induced at 24h after weaning, reaching the highest levels at 72h of involution (**Figure 22**). We also found an increased expression of capn4, the gene encoding the small regulatory subunit of both calpains (**Figure 22a**). Calpain activity was significantly increased at 48h weaning, reaching a four-fold induction at 72 h

compared with mice at the peak of lactation (**Figure 23**). Concomitantly with a decreased in the plasma membrane Ca^{2+} -transporter Atp2b2 (PMCA2), (**Figure 26**), the intracellular calcium levels, required for Calpain activity, rose within the involuting mammary gland at 6 h after forced weaning (**Figure 27**). Interestingly, Capn1 was mainly confined to the apical side of epithelial cells during lactation (**Figure 25**), likely where the main transporter PMCA2 is localized, pumping calcium into milk from the alveolar lumen (VanHouten et al. 2010). However, Capn2 showed a peripheral distribution closed to the plasma membrane (**Figure 25**).

Several cell adhesion and migration-related proteins have been reported to be targets of calpains. Proteins involved in cell adhesion, such as E-cadherin, β -Catenin, catenin p120 and Talin-1 were degraded during mammary gland involution by Capn2 (**Figures 30 & 31**). Furthermore, Capn2 colocalized with cell adhesion complexes, specifically with the protein E-Cdh (**Figure 34**). This mechanism could facilitate the release of epithelial cells to the acinar lumen of the mammary gland and consequently, to promote cell death by a process of anoikis.

III.2. Id2 as a node of transcriptional regulation in liver.

As mentioned above, Id2 is a pleiotropic protein involved in the modulation of a number of biological processes including cell proliferation and differentiation. Nevertheless, the molecular

mechanisms explaining Id2 functions are poorly understood. We performed an *in vivo* genome-wide ChIP/chip experiment for Id2 and E2F4 in adult mice liver. An Id2-containing complex was bound to a common sequence downstream from the TSS on a subset of 442 E2F4-target genes (**Figures 36 & 38b**). Id2 which lacks a DNA binding domain, was found to be bound to a protein complex on DNA, covering a large region with an average length of 277 bp. The computational analysis of biological functions for E2F4/Id2-targets suggested a role for this complex in tissue development and chromatin remodeling (**Figure 43**).

Id2 levels have been described to be crucial for its pleiotropic functions. We found a positive correlation between Id2 protein levels and the expression of E2F4/Id2-targets in fetal and adult liver. Id2 protein stability increased in fetal liver by interaction with USP1 de-ubiquitinating enzyme, which was induced during development (**Figures 50 & 52**). In adult liver, USP1 and Id2 levels dramatically decreased. We studied the dynamics of Id2-binding to gene promoters in 14d fetal liver. In differentiated liver tissue, when Id2 concentration is low, E2F4/Id2 was bound to the same GC-enriched region as paused Pol II and target genes remained transcriptionally inactive (**Figures 47, 48, 50, 54 & 56**). Conversely, in fetal liver when Id2 levels were increased, Id2 and Pol II were released from gene promoters and target genes up-regulated (**Figures 47, 48 & 56**). We observed that when genes were transcriptionally active in fetal liver, nucleosome assembly was favored at the region downstream from TSS (**Figures 48 & 56**). This behavior has been already observed in genes with paused Pol II. Our results suggest that Id2 takes part of a development-related

program. We wonder whether such a program could be reversible upon stimulation. Although liver regeneration is not a recapitulation of the embryonic program, both processes share key factors to promote cell proliferation (Otu et al. 2007). The same results as in fetal liver were obtained in a model of liver regeneration after partial hepatectomy (PHx). Id2/E2F4-bound genes were repressed in differentiated adult liver and induced upon Id2 release after PHx (**Figures 57 & 58**). Id2 complex bound to the same region and showed the same dynamics as paused Pol II on a selection of two gene promoters, Suv39h2 and jmjd6 in both animal models (**Figures 56 & 60**).

To sum up, we show here for the first time that Id2 is not only binding to unique genes described in the literature, but it seems to be part of a more general mechanism of gene expression regulation. In addition, our experiments suggest that Id2 in differentiated cells is part of a reversible program binding to a protein complex together with paused Pol II on a selection of gene promoters that remain responsive to specific stimuli.

III.3. Deregulation of transcriptional regulatory nodes: prospective implications in cancer.

Disruption of these transcriptional regulatory nodes is the basis of many diseases such as cancer. We have attempted to understand the selective regulation of Nf- κ B-inducible genes included in a particular

biological process during mammary gland involution. Nevertheless, NF- κ B not only modulates cell death and proliferation, but it is also involved in tumor development and progression by the induction of an inflammatory environment (Chariot, 2009) in some way similar to that one observed in the involuting mammary gland of mice. In fact, it has been suggested that deregulation of postlactational involution may act to facilitate tumor formation (Radisky & Hartmann, 2009; Schedin et al. 2007). Indeed, the elevated incidence of breast cancer associated with pregnancy has been suggested to be influenced by the tumor microenvironment developed in mammary gland after weaning (Lyons et al. 2011). In agreement with the tumor-promoting potential of the involuting mammary gland, we found that 81% of p65/p300-enriched genes passing the disease filter (MeSH), fell into the category of neoplasm. Therefore, the availability of a set of NF- κ B-target genes during mammary gland involution will represent an important instrument for further studies on both, the role of these genes in breast cancer, as well as the development of putative prognosis markers or new therapeutical targets.

On the other hand, the role of Id proteins in cancer has been of much interest in the last decade. Many of the transcriptional reprogramming induced in hepatocellular carcinoma mimics that of the developing liver (Coulouarn et al. 2005, Li et al. 2010) and therefore the role of Id2 in tumor progression could also be related to the deregulation of this program. The disease ranker analysis of E2F4/Id2 compared to E2F4-alone targets revealed that Id2 was bound to genes that were mainly related to the pathologic category of

neoplasm (**Figure 61**). An upstream deregulation of Id activity, going from Id gene transcription to Id protein, can result in the downstream deregulation of diverse genes. Aberrant Id2 expression has been reported in several cancer types (Norton, 2000; Lasorella et al. 2001; Yokota & Mori, 2002; Fong et al. 2004; Coma et al. 2010). Nevertheless, Id2 over-expression is not sufficient for cell transformation. Therefore, testing our model in the near future will require a more detail understanding of the interplay between paused Pol II complex and Id2.

Therefore, the results of this thesis represent a very important tool to further explore the molecular mechanisms involved in the modulation of these transcriptional regulatory nodes, as well as their effect on target genes, during the course of tumor development and progression.

IV. Conclusions.

This thesis might helped to elucidate the important role played by transcriptional regulatory nodes in a physiological context where overlapping biological processes take place in a coordinated manner. Specifically, we studied how two primary inputs, NF- κ B and Id2, trigger a particular output or a specific biological process in the mammary gland and liver. Disruption of these nodes of transcriptional regulation might result in the development of cancer. The specific findings of this thesis project are:

1. NF- κ B plays an important role as a node of transcriptional regulation during involution of the mammary gland after pregnancy/lactation cycle. 268 p65/p300-target genes mainly related to inflammation and apoptosis are identified. Calpain 1 and Calpain 2 are primary NF- κ B outputs. Both calpains seem to promote the destabilization of intercellular junctions and the shedding of epithelial cells into the lumen of the acini.
2. Id2 is part of a general mechanism of regulation of gene expression in liver. E2F4/Id2 binds to a common sequence in 440 genes. These genes are mainly involved in embryonic development and chromatin remodeling. Id2 seems to be part of a reversible development-related program involved in the pausing of Pol II on selected genes. Therefore, the final output of this node of regulation would be the liver development and tissue differentiation.

3. The bioinformatics analysis shows that both NF-kB and Id2 have a prominent role in cancer. 81% of all NF-KB target genes are involved in breast cancer. On the other hand, there are a higher percentage of E2F4/Id2 cancer-related target genes than those which do not bind Id2.

BIBLIOGRAFÍA

A

Abell K, Bilancio A, Clarkson RW, Tiffen PG, Altaparmakov AI, Burdon TG, et al. Stat3-induced apoptosis requires a molecular switch in PI(3)K subunit composition. *Nat Cell Biol.* 2005; 7(4): 392-8.

Albert T, Wells J, Funk JO, Pullner A, Raschke EE, Stelzer G, et al. The chromatin structure of the dual c-myc promoter P1/P2 is regulated by separate elements. *J Biol Chem.* 2001; 276(23): 20482-90.

Albrecht JH, Hansen LK. Cyclin D1 promotes mitogen-independent cell cycle progression in hepatocytes. *Cell Growth Differ.* 1999; 10(6): 397-404.

Albrecht JH, Meyer AH, Hu MY. Regulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 (WAF1/Cip1/Sdi1) gene expression in hepatic regeneration. *Hepatology.* 1997; 25(3): 557-63.

Alexander CM, Selvarajan S, Mudgett J, Werb Z. Stromelysin-1 regulates adipogenesis during mammary gland involution. *J Cell Biol.* 2001; 152(4): 693-703.

Alway SE, Degens H, Krishnamurthy G, Smith CA. Potential role for Id myogenic repressors in apoptosis and attenuation of hypertrophy in muscles of aged rats. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002; 283(1): C66-76.

Arnandis T, Ferrer-Vicens I, García-Trevijano ER, Miralles VJ, García C, Torres L, et al. Calpains mediate epithelial-cell death during mammary gland involution: mitochondria and lysosomal destabilization. *Cell Death Differ.* 2012; 19(9): 1536-48.

Arnandis T, Ferrer-Vicens I, Torres L, García C, Garcia-Trevijano ER, Zaragoza R, et al. Differential functions of calpain 1 during epithelial cell death and adipocyte differentiation in mammary gland involution. *Biochem J.* 2014; 459(2): 355-68.

B

Bai J, Odin JA. Apoptosis and the liver: relation to autoimmunity and related conditions. *Autoimmun Rev.* 2003; 2(1): 36-42.

Baki A, Tompa P, Alexa A, Molnár O, Friedrich P. Autolysis parallels activation of mu-calpain. *Biochem J.* 1996; 318 (Pt 3): 897-901.

Balciunaite E, Spektor A, Lents NH, Cam H, Te Riele H, Scime A, et al. Pocket protein complexes are recruited to distinct targets in quiescent and proliferating cells. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(18): 8166-78.

Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol.* 1996; 14: 649-83.

Baldwin AS Jr. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest.* 2001; 107(1): 3-6.

Bash J, Zong WX, Gélinas C. c-Rel arrests the proliferation of HeLa cells and affects critical regulators of the G1/S-phase transition. *Mol Cell Biol.* 1997; 17(11): 6526-36.

Bate N, Gingras AR, Bachir A, Horwitz R, Ye F, Patel B, et al. Talin contains a C-terminal calpain2 cleavage site important in focal adhesion dynamics. *PLoS One.* 2012; 7(4): e34461.

Baud V, Karin M. Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov.* 2009; 8(1): 33-40.

Baxter FO, Came PJ, Abell K, Kedjouar B, Huth M, Rajewsky K, et al. IKKbeta/2 induces TWEAK and apoptosis in mammary epithelial cells. *Development*. 2006; 133(17): 3485-94.

Beauchef G, Bigot N, Kypriotou M, Renard E, Porée B, Widom R, et al. The p65 subunit of NF- κ B inhibits COL1A1 gene transcription in human dermal and scleroderma fibroblasts through its recruitment on promoter by protein interaction with transcriptional activators (c-Krox, Sp1, and Sp3). *J Biol Chem*. 2012 J; 287(5): 3462-78.

Beaudry JB, Pierreux CE, Hayhurst GP, Plumb-Rudewiez N, Weiss MC, Rousseau GG, et al. Threshold levels of hepatocyte nuclear factor 6 (HNF-6) acting in synergy with HNF-4 and PGC-1alpha are required for time-specific gene expression during liver development. *Mol Cell Biol*. 2006; 26(16): 6037-46.

Benetti R, Copetti T, Dell'Orso S, Melloni E, Brancolini C, Monte M, et al. The calpain system is involved in the constitutive regulation of beta-catenin signaling functions. *J Biol Chem*. 2005; 280(23): 22070-80.

Benezra R, Davis RL, Lockshon D, Turner DL, Weintraub H. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell*. 1990; 61(1): 49-59.

Bettermann K, Vucur M, Haybaeck J, Koppe C, Janssen J, Heymann F, et al. TAK1 suppresses a NEMO-dependent but NF-kappaB-independent pathway to liver cancer. *Cancer Cell*. 2010; 17(5): 481-96.

Bevers MB, Neumar RW. Mechanistic role of calpains in postischemic neurodegeneration. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008; 28(4): 655-73.

Bohuslav J, Chen LF, Kwon H, Mu Y, Greene WC. p53 induces NF-kappaB activation by an IkappaB kinase-independent mechanism

involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1. *J Biol Chem.* 2004; 279(25): 26115-25.

Bounpheng MA, Dimas JJ, Dodds SG, Christy BA. Degradation of Id proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *FASEB J.* 1999; 13(15): 2257-64.

Bourgarel-Rey V, Vallee S, Rimet O, Champion S, Braguer D, Desobry A, et al. Involvement of nuclear factor kappaB in c-Myc induction by tubulin polymerization inhibitors. *Mol Pharmacol.* 2001; 59(5): 1165-70.

Boya P, Larrea E, Sola I, Majano PL, Jiménez C, Civeira MP, et al. Nuclear factor-kappa B in the liver of patients with chronic hepatitis C: decreased RelA expression is associated with enhanced fibrosis progression. *Hepatology.* 2001; 34(5): 1041-8.

Brantley DM, Yull FE, Muraoka RS, Hicks DJ, Cook CM, Kerr LD. Dynamic expression and activity of NF-kappaB during post-natal mammary gland morphogenesis. *Mech Dev.* 2000; 97(1-2): 149-55.

Budd RC. Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. *J Clin Invest.* 2002; 109(4): 437-41.

Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 1981; 112(2): 195-203.

Butler DC, Haramizu S, Williamson DL, Alway SE. Phospho-ablated Id2 is growth suppressive and pro-apoptotic in proliferating myoblasts. *PLoS One.* 2009; 4(7): e6302.

C

Caamaño J, Hunter CA. NF-kappaB family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(3): 414-29.

Calao M, Burny A, Quivy V, Dekoninck A, Van Lint C. A pervasive role of histone acetyltransferases and deacetylases in an NF-kappaB-signaling code. *Trends Biochem Sci.* 2008; 33(7): 339-49.

Cao Y, Karin M. NF-kappaB in mammary gland development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2003; 8(2): 215-23.

Carnovale CE, Ronco MT. Role of nitric oxide in liver regeneration. *Ann Hepatol.* 2012; 11(5): 636-47.

Carragher NO, Frame MC. Calpain: a role in cell transformation and migration. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002; 34(12): 1539-43.

Cataldo F, Peche LY, Klaric E, Brancolini C, Myers MP, Demarchi F, et al. CAPNS1 regulates USP1 stability and maintenance of genome integrity. *Mol Cell Biol.* 2013; 33(12): 2485-96.

Chan KT, Bennin DA, Huttenlocher A. Regulation of adhesion dynamics by calpain-mediated proteolysis of focal adhesion kinase (FAK). *J Biol Chem.* 2010 Apr; 285(15): 11418-26.

Chapman RS, Lourenco PC, Tonner E, Flint DJ, Selbert S, Takeda K, et al. Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes Dev.* 1999; 13(19): 2604-16.

Chariot A. The NF-kappaB-independent functions of IKK subunits in immunity and cancer. *Trends Cell Biol.* 2009; 19(8): 404-13.

Chen CR, Kang Y, Siegel PM, Massagué J. E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGFbeta receptor to c-myc repression. *Cell.* 2002; 110(1): 19-32.

Chen FE, Huang DB, Chen YQ, Ghosh G. Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA. *Nature.* 1998; 391(6665): 410-3.

Chen HZ, Tsai SY, Leone G. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9(11): 785-97.

Chen LF, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; 5(5): 392-401.

Chen LF, Mu Y, Greene WC. Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB. *EMBO J.* 2002; 21(23): 6539-48

Chen LF, Fischle W, Verdin E, Greene WC. Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. *Science.* 2001; 293(5535): 1653-7.

Chen LF, Williams SA, Mu Y, Nakano H, Duerr JM, Buckbinder L, et al. NF-kappaB RelA phosphorylation regulates RelA acetylation. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(18): 7966-75.

Chen XS, Zhang YH, Cai QY, Yao ZX. ID2: A negative transcription factor regulating oligodendroglia differentiation. *J Neurosci Res.* 2012; 90(5): 925-32.

Cheng S, Hsia CY, Leone G, Liou HC. Cyclin E and Bcl-xL cooperatively induce cell cycle progression in c-Rel^{-/-} B cells. *Oncogene.* 2003; 22(52): 8472-86.

Cirillo LA, Zaret KS. An early developmental transcription factor complex that is more stable on nucleosome core particles than on free DNA. *Mol Cell.* 1999; 4(6): 961-9.

Cirillo LA, Lin FR, Cuesta I, Friedman D, Jarnik M, Zaret KS. Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol Cell.* 2002; 9(2): 279-89.

Cirillo LA, McPherson CE, Bossard P, Stevens K, Cherian S, Shim EY, et al. Binding of the winged-helix transcription factor HNF3 to a linker histone site on the nucleosome. *EMBO J.* 1998; 17(1): 244-54.

Clarkson RW, Watson CJ. Microarray analysis of the involution switch. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2003; 8(3): 309-19.

Clarkson RW, Wayland MT, Lee J, Freeman T, Watson CJ. Gene expression profiling of mammary gland development reveals putative roles for death receptors and immune mediators in post-lactational regression. *Breast Cancer Res.* 2004; 6(2): R92-109.

Clarkson RW, Heeley JL, Chapman R, Aillet F, Hay RT, Wyllie A, et al. NF-kappaB inhibits apoptosis in murine mammary epithelia. *J Biol Chem.* 2000; 275(17): 12737-42.

Clemens JA, Stephenson DT, Yin T, Smalstig EB, Panetta JA, Little SP. Drug-induced neuroprotection from global ischemia is associated with prevention of persistent but not transient activation of nuclear factor-kappaB in rats. *Stroke.* 1998; 29(3): 677-82.

Cohen S, Achbert-Weiner H, Ciechanover A. Dual effects of I-kappaB kinase beta-mediated phosphorylation on p105 Fate: SCF(beta-TrCP)-dependent degradation and SCF(beta-TrCP)-independent processing. *Mol Cell Biol.* 2004; 24(1): 475-86.

Colnot S, Decaens T, Niwa-Kawakita M, Godard C, Hamard G, Kahn A, et al. Liver-targeted disruption of Apc in mice activates beta-catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101(49): 17216-21.

Coma S, Amin DN, Shimizu A, Lasorella A, Iavarone A, Klagsbrun M. Id2 promotes tumor cell migration and invasion through transcriptional repression of semaphorin 3F. *Cancer Res.* 2010; 70(9): 3823-32.

Connelly L, Barham W, Pigg R, Saint-Jean L, Sherrill T, Cheng DS, et al. Activation of nuclear factor kappa B in mammary epithelium promotes milk loss during mammary development and infection. *J Cell Physiol.* 2010; 222(1): 73-81.

Connelly L, Barham W, Onishko HM, Sherrill T, Chodosh LA, Blackwell TS, et al. Inhibition of NF-kappa B activity in mammary epithelium

increases tumor latency and decreases tumor burden. *Oncogene*. 2011; 30(12): 1402-12.

Coulouarn C, Derambure C, Lefebvre G, Daveau R, Hiron M, Scotte M, et al. Global gene repression in hepatocellular carcinoma and fetal liver, and suppression of dudulin-2 mRNA as a possible marker for the cirrhosis-to-tumor transition. *J Hepatol*. 2005; 42(6): 860-9.

Courtois G, Gilmore TD. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene*. 2006; 25(51): 6831-43.

Cressman DE, Diamond RH, Taub R. Rapid activation of the Stat3 transcription complex in liver regeneration. *Hepatology*. 1995; 21(5): 1443-9.

Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, et al. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science*. 1996; 274(5291): 1379-83.

Cross BM, Hack A, Reinhardt TA, Rao R. SPCA2 regulates Orai1 trafficking and store independent Ca²⁺ entry in a model of lactation. *PLoS One*. 2013; 8(6): e67348.

Cuevas BD, Abell AN, Witowsky JA, Yujiri T, Johnson NL, Kesavan K, et al. MEKK1 regulates calpain-dependent proteolysis of focal adhesion proteins for rear-end detachment of migrating fibroblasts. *EMBO J*. 2003; 22(13): 3346-55.

D

Damdinsuren B, Nagano H, Kondo M, Yamamoto H, Hiraoka N, Yamamoto T, et al. Expression of Id proteins in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation. *Int J Oncol.* 2005; 26(2): 319-27.

Dargelos E, Poussard S, Brulé C, Daury L, Cottin P. Calcium-dependent proteolytic system and muscle dysfunctions: a possible role of calpains in sarcopenia. *Biochimie.* 2008; 90(2): 359-68.

De Siervi A, De Luca P, Moiola C, Gueron G, Tongbai R, Chandramouli GV, et al. Identification of new Rel/NFkappaB regulatory networks by focused genome location analysis. *Cell Cycle.* 2009; 8(13): 2093-100.

Deed RW, Armitage S, Brown M, Norton JD. Regulation of Id-HLH transcription factor function in third messenger signalling. *Biochem Soc Trans.* 1996; 24(1): 5S.

Dejardin E, Bonizzi G, Bellahcène A, Castronovo V, Merville MP, Bours V. Highly-expressed p100/p52 (NFkB2) sequesters other NF-kappa B-related proteins in the cytoplasm of human breast cancer cells. *Oncogene.* 1995; 11(9): 1835-41.

Doi TS, Marino MW, Takahashi T, Yoshida T, Sakakura T, Old LJ, et al. Absence of tumor necrosis factor rescues RelA-deficient mice from embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(6): 2994-9.

Duran A, Diaz-Meco MT, Moscat J. Essential role of RelA Ser311 phosphorylation by zetaPKC in NF-kappaB transcriptional activation. *EMBO J.* 2003; 22(15): 3910-8.

Dutt P, Spriggs CN, Davies PL, Jia Z, Elce JS. Origins of the difference in Ca²⁺ requirement for activation of mu- and m-calpain. *Biochem J.* 2002; 367(Pt 1): 263-9.

Dutta J, Fan Y, Gupta N, Fan G, Gélinas C. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB. *Oncogene.* 2006; 25(51): 6800-16.

E

Eletr ZM, Wilkinson KD. Regulation of proteolysis by human deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1843(1): 114-28.

F

Faddy HM, Smart CE, Xu R, Lee GY, Kenny PA, Feng M, et al. Localization of plasma membrane and secretory calcium pumps in the mammary gland. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 369(3): 977-81.

Farazi PA, DePinho RA. The genetic and environmental basis of hepatocellular carcinoma. *Discov Med.* 2006; 6(35): 182-6.

Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol.* 2000; 32(1 Suppl): 19-31.

Ferrer-Vicens I, Riffo-Campos AL, Zaragozá R, García C, López-Rodas G, Viña JR, et al. In vivo genome-wide binding of Id2 to E2F4 target genes as part of a reversible program in mice liver. *Cell Mol Life Sci.* 2014. [Epub ahead of print]

FitzGerald MJ, Webber EM, Donovan JR, Fausto N. Rapid DNA binding by nuclear factor kappa B in hepatocytes at the start of liver regeneration. *Cell Growth Differ.* 1995; 6(4): 417-27.

Florio M, Hernandez MC, Yang H, Shu HK, Cleveland JL, Israel MA. Id2 promotes apoptosis by a novel mechanism independent of dimerization to basic helix-loop-helix factors. *Mol Cell Biol.* 1998; 18(9): 5435-44.

Fong S, Debs RJ, Desprez PY. Id genes and proteins as promising targets in cancer therapy. *Trends Mol Med.* 2004; 10(8): 387-92.

Franco SJ, Huttenlocher A. Regulating cell migration: calpains make the cut. *J Cell Sci.* 2005; 118(Pt 17): 3829-38.

Franco SJ, Rodgers MA, Perrin BJ, Han J, Bennin DA, Critchley DR, et al. Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nat Cell Biol.* 2004; 6(10): 977-83.

Friedman JM, Chung EY, Darnell JE Jr. Gene expression during liver regeneration. *J Mol Biol.* 1984; 179(1): 37-53.

G

Garcia-Santisteban I, Zorroza K, Rodriguez JA. Two nuclear localization signals in USP1 mediate nuclear import of the USP1/UAF1 complex. *PLoS One*. 2012; 7(6): e38570.

García-Trevijano ER, Torres L, Zaragoza R, Viña JR. The Role of Id2 in the Regulation of Chromatin Structure and Gene Expression. En Radzioch D. *Chromatin remodeling*. 2013; InTech, Croatia, pp. 91-112.

Geymayer S, Doppler W. Activation of NF-kappaB p50/p65 is regulated in the developing mammary gland and inhibits STAT5-mediated beta-casein gene expression. *FASEB J*. 2000; 14(9): 1159-70.

Ghosh G, van Duyne G, Ghosh S, Sigler PB. Structure of NF-kappa B p50 homodimer bound to a kappa B site. *Nature*. 1995; 373(6512): 303-10.

Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*. 2002; 109 Suppl: S81-96.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998; 16: 225-60.

Gilchrist DA, Adelman K. Coupling polymerase pausing and chromatin landscapes for precise regulation of transcription. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1819(7): 700-6.

Gilchrist DA, Dos Santos G, Fargo DC, Xie B, Gao Y, Li L, et al. Pausing of RNA polymerase II disrupts DNA-specified nucleosome organization to enable precise gene regulation. *Cell*. 2010; 143(4): 540-51.

Giroux S, Charron J. Defective development of the embryonic liver in N-myc-deficient mice. *Dev Biol.* 1998; 195(1): 16-28.

Glading A, Bodnar RJ, Reynolds IJ, Shiraha H, Satish L, Potter DA, et al. Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 2004; 24(6): 2499-512.

González Mdel C, Corton JC, Acero N, Muñoz-Mingarro D, Quirós Y, Alvarez-Millán JJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor α agonists differentially regulate inhibitor of DNA binding expression in rodents and human cells. *PPAR Res.* 2012; 2012: 483536.

Green KA, Lund LR. ECM degrading proteases and tissue remodelling in the mammary gland. *Bioessays.* 2005; 27(9): 894-903.

Grilli M, Goffi F, Memo M, Spano P. Interleukin-1beta and glutamate activate the NF-kappaB/Rel binding site from the regulatory region of the amyloid precursor protein gene in primary neuronal cultures. *J Biol Chem.* 1996; 271(25): 15002-7.

Grønning LM, Tingsabadh R, Hardy K, Dalen KT, Jat PS, Gnudi L, et al. Glucose induces increases in levels of the transcriptional repressor Id2 via the hexosamine pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006; 290(4): E599-606.

Guenther MG, Levine SS, Boyer LA, Jaenisch R, Young RA. A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell.* 2007; 130(1): 77-88.

Guo L, Lan J, Lin Y, Guo P, Nie Q, Mao Q, et al. Hypoxia/ischemia up-regulates Id2 expression in neuronal cells in vivo and in vitro. *Neurosci Lett*. 2013; 554: 88-93.

Gutiérrez SH, Kuri MR, del Castillo ER. Cardiac role of the transcription factor NF-kappaB. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2008; 8(2): 153-60.

Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS Jr. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol*. 1999; 19(8): 5785-99.

H

Hacker C, Kirsch RD, Ju XS, Hieronymus T, Gust TC, Kuhl C, et al. Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development. *Nat Immunol*. 2003; 4(4): 380-6.

Hara E, Hall M, Peters G. Cdk2-dependent phosphorylation of Id2 modulates activity of E2A-related transcription factors. *EMBO J*. 1997; 16(2): 332-42.

Hargreaves DC, Horng T, Medzhitov R. Control of inducible gene expression by signal-dependent transcriptional elongation. *Cell*. 2009; 138(1): 129-45.

Havrda MC, Paoletta BR, Ran C, Jering KS, Wray CM, Sullivan JM, et al. Id2 mediates oligodendrocyte precursor cell maturation arrest and is

tumorigenic in a PDGF-rich microenvironment. *Cancer Res.* 2014; 74(6): 1822-32.

Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell.* 2008; 132(3): 344-62.

He G, Yu GY, Temkin V, Ogata H, Kuntzen C, Sakurai T, et al. Hepatocyte IKKbeta/NF-kappaB inhibits tumor promotion and progression by preventing oxidative stress-driven STAT3 activation. *Cancer Cell.* 2010; 17(3): 286-97.

Hentsch B, Lyons I, Li R, Hartley L, Lints TJ, Adams JM, et al. Hlx homeo box gene is essential for an inductive tissue interaction that drives expansion of embryonic liver and gut. *Genes Dev.* 1996; 10(1): 70-9.

Herbst A, Kolligs FT. Wnt signaling as a therapeutic target for cancer. *Methods Mol Biol.* 2007; 361: 63-91.

Heuberger J, Birchmeier W. Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010; 2(2): a002915.

Hilberg F, Aguzzi A, Howells N, Wagner EF. c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature.* 1993; 365(6442): 179-81.

Hinata K, Gervin AM, Jennifer Zhang Y, Khavari PA. Divergent gene regulation and growth effects by NF-kappa B in epithelial and mesenchymal cells of human skin. *Oncogene.* 2003; 22(13): 1955-64.

Hinz M, Krappmann D, Eichten A, Heder A, Scheidereit C, Strauss M. NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol.* 1999; 19(4): 2690-8.

Hinz M, Löser P, Mathas S, Krappmann D, Dörken B, Scheidereit C. Constitutive NF-kappaB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood.* 2001; 97(9): 2798-807.

Hirano F, Tanaka H, Hirano Y, Hiramoto M, Handa H, Makino I, et al. Functional interference of Sp1 and NF-kappaB through the same DNA binding site. *Mol Cell Biol.* 1998 Mar;18(3):1266-74.

Hoesel B1, Schmid JA. The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer.* 2013; 12-86.

Hood JL, Brooks WH, Roszman TL. Subcellular mobility of the calpain/calpastatin network: an organelle transient. *Bioessays.* 2006; 28(8): 850-9.

Hortelano S, Dewez B, Genaro AM, Díaz-Guerra MJ, Boscá L. Nitric oxide is released in regenerating liver after partial hepatectomy. *Hepatology.* 1995; 21(3): 776-86.

Hösel M, Quasdorff M, Wiegmann K, Webb D, Zedler U, Broxtermann M, et al. Not interferon, but interleukin-6 controls early gene expression in hepatitis B virus infection. *Hepatology.* 2009; 50(6): 1773-82.

Hsia CY, Cheng S, Owyang AM, Dowdy SF, Liou HC. c-Rel regulation of the cell cycle in primary mouse B lymphocytes. *Int Immunol.* 2002; 14(8): 905-16.

Hu TH, Huang CC, Lin PR, Chang HW, Ger LP, Lin YW, et al. Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 2003; 97(8): 1929-40.

Hua H, Sarvetnick N. ID2 promotes the expansion and survival of growth-arrested pancreatic beta cells. *Endocrine.* 2007; 32(3): 329-37.

Huang H, Fujii H, Sankila A, Mahler-Araujo BM, Matsuda M, Cathomas G, et al. Beta-catenin mutations are frequent in human hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C virus infection. *Am J Pathol.* 1999; 155(6): 1795-801.

Humphreys RC, Bierie B, Zhao L, Raz R, Levy D, Hennighausen L. Deletion of Stat3 blocks mammary gland involution and extends functional competence of the secretory epithelium in the absence of lactogenic stimuli. *Endocrinology.* 2002; 143(9): 3641-50.

I

Iavarone A, Garg P, Lasorella A, Hsu J, Israel MA. The helix-loop-helix protein Id-2 enhances cell proliferation and binds to the retinoblastoma protein. *Genes Dev.* 1994; 8(11): 1270-84.

Iavarone A, King ER, Dai XM, Leone G, Stanley ER, Lasorella A. Retinoblastoma promotes definitive erythropoiesis by repressing Id2 in fetal liver macrophages. *Nature*. 2004; 432(7020): 1040-5.

Ikawa T, Fujimoto S, Kawamoto H, Katsura Y, Yokota Y. Commitment to natural killer cells requires the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(9): 5164-9.

Inokuchi S, Aoyama T, Miura K, Osterreicher CH, Kodama Y, Miyai K, et al. Disruption of TAK1 in hepatocytes causes hepatic injury, inflammation, fibrosis, and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(2): 844-9.

Ito K, Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol Cell Biol*. 2000; 20(18): 6891-903.

Iwai M, Cui TX, Kitamura H, Saito M, Shimazu T. Increased secretion of tumour necrosis factor and interleukin 6 from isolated, perfused liver of rats after partial hepatectomy. *Cytokine*. 2001; 13(1): 60-64.

K

Kamiya A, Kakinuma S, Onodera M, Miyajima A, Nakauchi H. Prospero-related homeobox 1 and liver receptor homolog 1 coordinately regulate long-term proliferation of murine fetal hepatoblasts. *Hepatology*. 2008; 48(1): 252-64.

Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A. Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol*. 1999; 9(11): 601-4.

Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol*. 2000; 18: 621-63.

Kasibhatla S, Brunner T, Genestier L, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR. DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Mol Cell*. 1998; 1(4): 543-51.

Kawate S, Takenoshita S, Ohwada S, Mogi A, Fukusato T, Makita F, et al. Mutation analysis of transforming growth factor beta type II receptor, Smad2, and Smad4 in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*. 1999; 14(1): 127-31.

Kiernan R, Brès V, Ng RW, Coudart MP, El Messaoudi S, Sardet C, et al. Post-activation turn-off of NF-kappa B-dependent transcription is regulated by acetylation of p65. *J Biol Chem*. 2003; 278(4): 2758-66.

Kim HJ, Hong JM, Yoon KA, Kim N, Cho DW, Choi JY, et al. Early growth response 2 negatively modulates osteoclast differentiation through upregulation of Id helix-loop-helix proteins. *Bone*. 2012; 51(4): 643-50.

Kim JM, Parmar K, Huang M, Weinstock DM, Ruit CA, Kutok JL, et al. Inactivation of murine Usp1 results in genomic instability and a Fanconi anemia phenotype. *Dev Cell*. 2009; 16(2): 314-20.

Kim NS, Kim HT, Kwon MC, Choi SW, Kim YY, Yoon KJ, et al. Survival and differentiation of mammary epithelial cells in mammary gland

development require nuclear retention of Id2 due to RANK signaling. *Mol Cell Biol.* 2011; 31(23): 4775-88.

Kirilova I, Chaisson M, Fausto N. Tumor necrosis factor induces DNA replication in hepatic cells through nuclear factor kappaB activation. *Cell Growth Differ.* 1999; 10(12): 819-28.

Klose CS, Flach M, Möhle L, Rogell L, Hoyler T, Ebert K, et al. Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. *Cell.* 2014; 157(2): 340-56.

Koniaris LG, McKillop IH, Schwartz SI, Zimmers TA. Liver regeneration. *J Am Coll Surg.* 2003; 197(4): 634-59.

Köntgen F, Grumont RJ, Strasser A, Metcalf D, Li R, Tarlinton D, et al. Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes Dev.* 1995; 9(16): 1965-77.

Kosters A, Karpen SJ. The role of inflammation in cholestasis: clinical and basic aspects. *Semin Liver Dis.* 2010; 30(2): 186-94.

Kritikou EA, Sharkey A, Abell K, Came PJ, Anderson E, Clarkson RW, et al. A dual, non-redundant, role for LIF as a regulator of development and STAT3-mediated cell death in mammary gland. *Development.* 2003; 130(15): 3459-68.

Krumm A, Meulia T, Brunvand M, Groudine M. The block to transcriptional elongation within the human c-myc gene is determined in the promoter-proximal region. *Genes Dev.* 1992; 6(11): 2201-13.

Krupczak-Hollis K, Wang X, Kalinichenko VV, Gusarova GA, Wang IC, Dennewitz MB, et al. The mouse Forkhead Box m1 transcription factor is essential for hepatoblast mitosis and development of intrahepatic bile ducts and vessels during liver morphogenesis. *Dev Biol.* 2004; 276(1): 74-88.

Kucharczak J, Simmons MJ, Fan Y, G elinas C. To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene.* 2003; 22(56): 8961-82.

Kurooka H, Yokota Y. Nucleo-cytoplasmic shuttling of Id2, a negative regulator of basic helix-loop-helix transcription factors. *J Biol Chem.* 2005; 280(6): 4313-20.

Kyrmizi I, Hatzis P, Katrakili N, Tronche F, Gonzalez FJ, Talianidis I. Plasticity and expanding complexity of the hepatic transcription factor network during liver development. *Genes Dev.* 2006; 20(16): 2293-305.

L

Laemmli UK, Beguin F, Gujer-Kellenberger G. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol.* 1970; 47(1): 69-85.

Lasorella A, Uo T, Iavarone A. Id proteins at the cross-road of development and cancer. *Oncogene.* 2001; 20(58): 8326-33.

Lasorella A, Benezra R, Iavarone A. The ID proteins: master regulators of cancer stem cells and tumour aggressiveness. *Nat Rev Cancer*. 2014; 14(2): 77-91.

Lasorella A, Nosedà M, Beyna M, Yokota Y, Iavarone A. Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins. *Nature*. 2000; 407(6804): 592-8.

Lee JS, Ward WO, Ren H, Vallanat B, Darlington GJ, Han ES, et al. Meta-analysis of gene expression in the mouse liver reveals biomarkers associated with inflammation increased early during aging. *Mech Ageing Dev*. 2012a; 133(7): 467-78.

Lee YF, Miller LD, Chan XB, Black MA, Pang B, Ong CW, et al. JMJD6 is a driver of cellular proliferation and motility and a marker of poor prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2012b; 14(3): R85.

Leitges M, Sanz L, Martín P, Duran A, Braun U, García JF, et al. Targeted disruption of the zetaPKC gene results in the impairment of the NF-kappaB pathway. *Mol Cell*. 2001; 8(4): 771-80.

Leloup L, Wells A. Calpains as potential anti-cancer targets. *Expert Opin Ther Targets*. 2011; 15(3): 309-23.

Levy D, Kuo AJ, Chang Y, Schaefer U, Kitson C, Cheung P, et al. Lysine methylation of the NF- κ B subunit RelA by SETD6 couples activity of the histone methyltransferase GLP at chromatin to tonic repression of NF- κ B signaling. *Nat Immunol*. 2011; 12(1): 29-36.

Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2(10): 725-34.

Li T, Wan B, Huang J, Zhang X. Comparison of gene expression in hepatocellular carcinoma, liver development, and liver regeneration. *Mol Genet Genomics.* 2010; 283(5): 485-92.

Lin B, Williams-Skipp C, Tao Y, Schleicher MS, Cano LL, Duke RC, et al. NF-kappaB functions as both a proapoptotic and antiapoptotic regulatory factor within a single cell type. *Cell Death Differ.* 1999; 6(6): 570-82.

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.* 1996; 16(5): 2248-54.

Lin YZ, Yao SY, Veach RA, Torgerson TR, Hawiger J. Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J Biol Chem.* 1995; 270(24): 14255-8.

Liu J, Shi W, Warburton D. A cysteine residue in the helix-loop-helix domain of Id2 is critical for homodimerization and function. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 273(3): 1042-7.

Liu L, Xing D, Chen WR. Micro-calpain regulates caspase-dependent and apoptosis inducing factor-mediated caspase-independent apoptotic pathways in cisplatin-induced apoptosis. *Int J Cancer.* 2009; 125(12): 2757-66.

Liu RM, Gaston Pravia KA. Oxidative stress and glutathione in TGF-beta-mediated fibrogenesis. *Free Radic Biol Med.* 2010; 48(1): 1-15.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25(4): 402-8.

Lomberk G, Urrutia R. The family feud: turning off Sp1 by Sp1-like KLF proteins. *Biochem J.* 2005; 392(Pt 1): 1-11.

Luedde T, Heinrichsdorff J, de Lorenzi R, De Vos R, Roskams T, Pasparakis M. IKK1 and IKK2 cooperate to maintain bile duct integrity in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(28): 9733-8.

Luedde T, Beraza N, Kotsikoris V, van Loo G, Nenci A, De Vos R, et al. Deletion of NEMO/IKKgamma in liver parenchymal cells causes steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell.* 2007; 11(2): 119-32.

Lund LR, Rømer J, Thomasset N, Solberg H, Pyke C, Bissell MJ, et al. Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways. *Development.* 1996; 122(1): 181-93.

Lyons TR, O'Brien J, Borges VF, Conklin MW, Keely PJ, Eliceiri KW, et al. Postpartum mammary gland involution drives progression of ductal carcinoma in situ through collagen and COX-2. *Nat Med.* 2011; 17(9): 1109-15.

M

Maeda S, Kamata H, Luo JL, Leffert H, Karin M. IKKbeta couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell*. 2005; 121(7): 977-90.

Makita J, Kurooka H, Mori K, Akagi Y, Yokota Y. Identification of the nuclear export signal in the helix-loop-helix inhibitor Id1. *FEBS Lett*. 2006; 580(7): 1812-6.

Mandrekar P, Szabo G. Signalling pathways in alcohol-induced liver inflammation. *J Hepatol*. 2009; 50(6): 1258-66.

Marianneau P, Cardona A, Edelman L, Deubel V, Desprès P. Dengue virus replication in human hepatoma cells activates NF-kappaB which in turn induces apoptotic cell death. *J Virol*. 1997; 71(4): 3244-9.

Marienfeld R, May MJ, Berberich I, Serfling E, Ghosh S, Neumann M. RelB forms transcriptionally inactive complexes with RelA/p65. *J Biol Chem*. 2003; 278(22): 19852-60.

Martinsen BJ, Bronner-Fraser M. Neural crest specification regulated by the helix-loop-helix repressor Id2. *Science*. 1998; 281(5379): 988-91.

Marusawa H, Hijikata M, Chiba T, Shimotohno K. Hepatitis C virus core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappaB activation. *J Virol*. 1999; 73(6): 4713-20.

Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 1998; 67: 753-91.

Massari ME, Murre C. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol.* 2000; 20(2): 429-40.

Matsui T, Kinoshita T, Hirano T, Yokota T, Miyajima A. STAT3 down-regulates the expression of cyclin D during liver development. *J Biol Chem.* 2002; 277(39): 36167-73.

Matsumura ME, Lobe DR, McNamara CA. Contribution of the helix-loop-helix factor Id2 to regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem.* 2002; 277(9): 7293-7.

McDaniel SM, Rumer KK, Biroc SL, Metz RP, Singh M, Porter W, et al. Remodeling of the mammary microenvironment after lactation promotes breast tumor cell metastasis. *Am J Pathol.* 2006; 168(2): 608-20.

Michalopoulos GK. Principles of liver regeneration and growth homeostasis. *Compr Physiol.* 2013; 3(1): 485-513.

Michalopoulos GK. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol.* 2010; 176(1): 2-13.

Monks J, Rosner D, Geske FJ, Lehman L, Hanson L, Neville MC, et al. Epithelial cells as phagocytes: apoptotic epithelial cells are engulfed by mammary alveolar epithelial cells and repress inflammatory mediator release. *Cell Death Differ.* 2005; 12(2): 107-14.

Morello D, Fitzgerald MJ, Babinet C, Fausto N. c-myc, c-fos, and c-jun regulation in the regenerating livers of normal and H-2K/c-myc transgenic mice. *Mol Cell Biol.* 1990; 10(6): 3185-93.

Mori S, Nishikawa SI, Yokota Y. Lactation defect in mice lacking the helix-loop-helix inhibitor Id2. *EMBO J.* 2000; 19(21): 5772-81.

Morio LA, Chiu H, Sprowles KA, Zhou P, Heck DE, Gordon MK, et al. Distinct roles of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide in acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001; 172(1): 44-51.

Müller CW, Rey FA, Sodeoka M, Verdine GL, Harrison SC. Structure of the NF-kappa B p50 homodimer bound to DNA. *Nature.* 1995; 373(6512): 311-7.

Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods.* 2008; 5(7): 621-8.

Murre C, McCaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Jan YN, et al. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell.* 1989; 58(3): 537-44.

N

Nagata Y, Shoji W, Obinata M, Todokoro K. Phosphorylation of helix-loop-helix proteins ID1, ID2 and ID3. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 207(3): 916-26.

Nakayama M, Matsumoto K, Tatsumi N, Yanai M, Yokouchi Y. Id3 is important for proliferation and differentiation of the hepatoblasts during the chick liver development. *Mech Dev.* 2006; 123(7): 580-90.

Nemova NN, Lysenko LA, Kantserova NP. [Proteinases of the calpain family: structure and functions]. *Ontogenez.* 2010; 41(5): 381-9.

Nishina H, Vaz C, Billia P, Nghiem M, Sasaki T, De la Pompa JL, et al. Defective liver formation and liver cell apoptosis in mice lacking the stress signaling kinase SEK1/MKK4. *Development.* 1999; 126(3): 505-16.

Norton JD. ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J Cell Sci.* 2000; 113 (Pt 22): 3897-905.

Norton JD, Atherton GT. Coupling of cell growth control and apoptosis functions of Id proteins. *Mol Cell Biol.* 1998; 18(4): 2371-81.

Norton JD, Deed RW, Craggs G, Sablitzky F. Id helix-loop-helix proteins in cell growth and differentiation. *Trends Cell Biol.* 1998; 8(2): 58-65.

Nozaki K, Das A, Ray SK, Banik NL. Calpeptin attenuated apoptosis and intracellular inflammatory changes in muscle cells. *J Neurosci Res.* 2011; 89(4): 536-43.

Nuzhdin SV, Rychkova A, Hahn MW. The strength of transcription-factor binding modulates co-variation in transcriptional networks. *Trends Genet.* 2010 Feb; 26(2):51-3.

O

Ohno H, Uemura K, Shintani-Ishida K, Nakamura M, Inomata M, Yoshida K. Ischemia promotes calpain-mediated degradation of p120-catenin in SH-SY5Y cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 353(3): 547-52.

Otu HH, Naxerova K, Ho K, Can H, Nesbitt N, Libermann TA, et al. Restoration of liver mass after injury requires proliferative and not embryonic transcriptional patterns. *J Biol Chem.* 2007; 282(15): 11197-204.

P

Penella E, Sandoval J, Zaragoza R, García C, Viña JR, Torres L, et al. Molecular mechanisms of Id2 down-regulation in rat liver after acetaminophen overdose. Protection by N-acetyl-L-cysteine. *Free Radic Res.* 2010; 44(9): 1044-53.

Pensa S, Neoh K, Resemann HK, Kreuzaler PA, Abell K, Clarke NJ, et al. The PI3K regulatory subunits p55 α and p50 α regulate cell death in vivo. *Cell Death Differ.* 2014. [Epub ahead of print]

Perkins ND. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene*. 2006; 25(51): 6717-30.

Perkins ND, Felzien LK, Betts JC, Leung K, Beach DH, Nabel GJ. Regulation of NF-kappaB by cyclin-dependent kinases associated with the p300 coactivator. *Science*. 1997; 275(5299): 523-7.

Peters AH, O'Carroll D, Scherthan H, Mechtler K, Sauer S, Schöfer C, et al. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell*. 2001; 107(3): 323-37.

Piazzolla D, Meissl K, Kucerova L, Rubiolo C, Baccharini M. Raf-1 sets the threshold of Fas sensitivity by modulating Rok-alpha signaling. *J Cell Biol*. 2005; 171(6): 1013-22.

Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*. 2004; 431(7007): 461-6.

Pohl T, Gugasyan R, Grumont RJ, Strasser A, Metcalf D, Tarlinton D, et al. The combined absence of NF-kappa B1 and c-Rel reveals that overlapping roles for these transcription factors in the B cell lineage are restricted to the activation and function of mature cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(7): 4514-9.

Potter SW, Gaza G, Morris JE. Estradiol induces E-cadherin degradation in mouse uterine epithelium during the estrous cycle and early pregnancy. *J Cell Physiol*. 1996; 169(1): 1-14.

Pullan S, Wilson J, Metcalfe A, Edwards GM, Goberdhan N, Tilly J, et al. Requirement of basement membrane for the suppression of programmed cell death in mammary epithelium. *J Cell Sci.* 1996; 109(3): 631-42.

Q

Qin ZH, Chen RW, Wang Y, Nakai M, Chuang DM, Chase TN. Nuclear factor kappaB nuclear translocation upregulates c-Myc and p53 expression during NMDA receptor-mediated apoptosis in rat striatum. *J Neurosci.* 1999; 19(10): 4023-33.

R

Radisky DC, Hartmann LC. Mammary involution and breast cancer risk: transgenic models and clinical studies. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2009; 14(2): 181-91.

Rai RM, Lee FY, Rosen A, Yang SQ, Lin HZ, Koteish A, et al. Impaired liver regeneration in inducible nitric oxide synthasedeficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(23): 13829-34.

Ramirez-Carrozzi VR1, Braas D, Bhatt DM, Cheng CS, Hong C, Doty KR, et al. A unifying model for the selective regulation of inducible transcription by CpG islands and nucleosome remodeling. *Cell.* 2009; 138(1): 114-28.

Rayman JB, Takahashi Y, Indjeian VB, Dannenberg JH, Catchpole S, Watson RJ, et al. E2F mediates cell cycle-dependent transcriptional repression in vivo by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex. *Genes Dev.* 2002; 16(8): 933-47.

Reddy JK, Rao MS. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006; 290(5): G852-8.

Reinehr R, Häussinger D. CD95 activation in the liver: ion fluxes and oxidative signaling. *Arch Biochem Biophys.* 2007; 462(2): 124-31.

Reinehr R, Sommerfeld A, Häussinger D. CD95 ligand is a proliferative and antiapoptotic signal in quiescent hepatic stellate cells. *Gastroenterology.* 2008; 134(5): 1494-506.

Reinhardt TA, Lippolis JD. Mammary gland involution is associated with rapid down regulation of major mammary Ca²⁺-ATPases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 378(1): 99-102.

Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med.* 2010; 49(11): 1603-16.

Rice NR, MacKichan ML, Israël A. The precursor of NF-kappa B p50 has I kappa B-like functions. *Cell.* 1992; 71(2): 243-53.

Riehle KJ, Dan YY, Campbell JS, Fausto N. New concepts in liver regeneration. *Gastroenterol Hepatol.* 2011; 26(7): 1218.

Rios-Doria J, Day KC, Kuefer R, Rashid MG, Chinnaiyan AM, Rubin MA, et al. The role of calpain in the proteolytic cleavage of E-cadherin in prostate and mammary epithelial cells. *J Biol Chem.* 2003; 278(2): 1372-9.

Rodríguez JL, Sandoval J, Serviddio G, Sastre J, Morante M, Perrelli MG, et al. Id2 leaves the chromatin of the E2F4-p130-controlled c-myc promoter during hepatocyte priming for liver regeneration. *Biochem J.* 2006; 398(3): 431-7.

Romieu-Mourez R, Kim DW, Shin SM, Demicco EG, Landesman-Bollag E, Seldin DC, et al. Mouse mammary tumor virus c-rel transgenic mice develop mammary tumors. *Mol Cell Biol.* 2003; 23(16): 5738-54.

Ronco MT, Francés D, de Luján Alvarez M, Quiroga A, Monti J, Parody JP, et al. Vascular endothelial growth factor and nitric oxide in rat liver regeneration. *Life Sci.* 2007; 81(9): 750-5.

Rothschild G, Zhao X, Iavarone A, Lasorella A. E Proteins and Id2 converge on p57Kip2 to regulate cell cycle in neural cells. *Mol Cell Biol.* 2006; 26(11): 4351-61.

Ruzinova MB, Benezra R. Id proteins in development, cell cycle and cancer. *Trends Cell Biol.* 2003; 13(8): 410-8.

S

Sakurai T, Maeda S, Chang L, Karin M. Loss of hepatic NF-kappa B activity enhances chemical hepatocarcinogenesis through sustained c-

Jun N-terminal kinase 1 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(28): 10544-51.

Sandoval J, Rodríguez JL, Tur G, Serviddio G, Pereda J, Boukaba A, et al. RNAPol-ChIP: a novel application of chromatin immunoprecipitation to the analysis of real-time gene transcription. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32(11): e88.

Satoh T, Kaziro Y. Ras in signal transduction. *Semin Cancer Biol.* 1992; 3(4): 169-77.

Schedin P, O'Brien J, Rudolph M, Stein T, Borges V. Microenvironment of the involuting mammary gland mediates mammary cancer progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2007; 12(1): 71-82.

Schere-Levy C, Buggiano V, Quaglino A, Gattelli A, Cirio MC, Piazzon I, et al. Leukemia inhibitory factor induces apoptosis of the mammary epithelial cells and participates in mouse mammary gland involution. *Exp Cell Res.* 2003; 282(1): 35-47.

Schorr K, Li M, Bar-Peled U, Lewis A, Heredia A, Lewis B, et al. Gain of Bcl-2 is more potent than bax loss in regulating mammary epithelial cell survival in vivo. *Cancer Res.* 1999; 59(11): 2541-5.

Segal E, Fondufe-Mittendorf Y, Chen L, Thåström A, Field Y, Moore IK, et al. A genomic code for nucleosome positioning. *Nature.* 2006 Aug; 442(7104): 772-8.

Seitz CS, Deng H, Hinata K, Lin Q, Khavari PA. Nuclear factor kappaB subunits induce epithelial cell growth arrest. *Cancer Res.* 2000; 60(15): 4085-92.

Sergi C, Kahl P, Otto HF. Contribution of apoptosis and apoptosis-related proteins to the malformation of the primitive intrahepatic biliary system in Meckel syndrome. *Am J Pathol.* 2000; 156(5): 1589-98.

Shaulian E. AP-1--The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? *Cell Signal.* 2010; 22(6): 894-9.

Shih VF, Tsui R, Caldwell A, Hoffmann A. A single NFkB system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Res.* 2011; 21(1): 86-102.

Siegel PM, Shu W, Massagué J. Mad upregulation and Id2 repression accompany transforming growth factor (TGF)-beta-mediated epithelial cell growth suppression. *J Biol Chem.* 2003; 278(37): 35444-50.

Siu PM, Alway SE. Subcellular responses of p53 and Id2 in fast and slow skeletal muscle in response to stretch-induced overload. *J Appl Physiol (1985).* 2005; 99(5): 1897-904.

Siu PM, Pistilli EE, Murlasits Z, Alway SE. Hindlimb unloading increases muscle content of cytosolic but not nuclear Id2 and p53 proteins in young adult and aged rats. *J Appl Physiol (1985).* 2006; 100(3): 907-16.

Skaug B, Jiang X, Chen ZJ. The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways. *Annu Rev Biochem.* 2009; 78: 769-96.

Smale ST. Selective transcription in response to an inflammatory stimulus. *Cell*. 2010 Mar; 140(6): 833-44.

Solan NJ, Miyoshi H, Carmona EM, Bren GD, Paya CV. RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100. *J Biol Chem*. 2002; 277(2): 1405-18.

Sovak MA, Bellas RE, Kim DW, Zanieski GJ, Rogers AE, Traish AM, et al. Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest*. 1997; 100(12): 2952-60.

Stein T, Morris JS, Davies CR, Weber-Hall SJ, Duffy MA, Heath VJ, et al. Involution of the mouse mammary gland is associated with an immune cascade and an acute-phase response, involving LBP, CD14 and STAT3. *Breast Cancer Res*. 2004; 6(2): R75-91.

Storr SJ, Carragher NO, Frame MC, Parr T, Martin SG. The calpain system and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11(5): 364-74.

Su AI, Guidotti LG, Pezacki JP, Chisari FV, Schultz PG. Gene expression during the priming phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(17): 11181-6.

T

Tai DI, Tsai SL, Chen YM, Chuang YL, Peng CY, Sheen IS, et al. Activation of nuclear factor kappaB in hepatitis C virus infection: implications for pathogenesis and hepatocarcinogenesis. *Hepatology*. 2000; 31(3): 656-64.

Teixeiro E, García-Sahuquillo A, Alarcón B, Bragado R. Apoptosis-resistant T cells have a deficiency in NF-kappaB-mediated induction of Fas ligand transcription. *Eur J Immunol.* 1999; 29(3): 745-54.

Tenniswood MP, Guenette RS, Lakins J, Mooibroek M, Wong P, Welsh JE. Active cell death in hormone-dependent tissues. *Cancer Metastasis Rev.* 1992; 11(2): 197-220.

Terada T, Nakanuma Y. Detection of apoptosis and expression of apoptosis-related proteins during human intrahepatic bile duct development. *Am J Pathol.* 1995; 146(1): 67-74.

Thiede MA, Rodan GA. Expression of a calcium-mobilizing parathyroid hormone-like peptide in lactating mammary tissue. *Science.* 1988; 242(4876): 278-80.

Thoreson MA, Anastasiadis PZ, Daniel JM, Ireton RC, Wheelock MJ, Johnson KR, et al. Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. *J Cell Biol.* 2000; 148(1): 189-202.

Tofighi R, Johansson C, Goldoni M, Ibrahim WN, Gogvadze V, Mutti A, et al. Hippocampal neurons exposed to the environmental contaminants methylmercury and polychlorinated biphenyls undergo cell death via parallel activation of calpains and lysosomal proteases. *Neurotox Res.* 2011; 19(1): 183-94.

Torres L, Sandoval J, Penella E, Zaragoza R, García C, Rodríguez JL, et al. In vivo GSH depletion induces c-myc expression by modulation of chromatin protein complexes. *Free Radic Biol Med.* 2009; 46(11): 1534-42.

Trabosh VA, Divito KA, D Aguda B, Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS. Sequestration of E12/E47 and suppression of p27KIP1 play a role in Id2-induced proliferation and tumorigenesis. *Carcinogenesis*. 2009; 30(7): 1252-9.

Trautwein C, Rakemann T, Niehof M, Rose-John S, Manns MP. Acute-phase response factor, increased binding, and target gene transcription during liver regeneration. *Gastroenterology*. 1996; 110(6): 1854-62.

Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(9): 5116-21.

V

Vainer GW, Pikarsky E, Ben-Neriah Y. Contradictory functions of NF-kappaB in liver physiology and cancer. *Cancer Lett*. 2008; 267(2): 182-8.

Vallorosi CJ, Day KC, Zhao X, Rashid MG, Rubin MA, Johnson KR, et al. Truncation of the beta-catenin binding domain of E-cadherin precedes epithelial apoptosis during prostate and mammary involution. *J Biol Chem*. 2000; 275(5): 3328-34.

van Hogerlinden M, Rozell BL, Ahrlund-Richter L, Toftgård R. Squamous cell carcinomas and increased apoptosis in skin with

inhibited Rel/nuclear factor-kappaB signaling. *Cancer Res.* 1999; 59(14): 3299-303.

van Oevelen C, Wang J, Asp P, Yan Q, Kaelin WG Jr, Kluger Y, et al. A role for mammalian Sin3 in permanent gene silencing. *Mol Cell.* 2008; 32(3): 359-70.

VanHouten J, Sullivan C, Bazinet C, Ryoo T, Camp R, Rimm DL, et al. PMCA2 regulates apoptosis during mammary gland involution and predicts outcome in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(25): 11405-10.

Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif.* 2003; 36(3): 165-75.

Vermeulen L, De Wilde G, Van Damme P, Vanden Berghe W, Haegeman G. Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *EMBO J.* 2003; 22(6): 1313-24.

Videla LA, Tapia G, Rodrigo R, Pettinelli P, Haim D, Santibañez C, et al. Liver NF-kappaB and AP-1 DNA binding in obese patients. *Obesity (Silver Spring).* 2009; 17(5): 973-9.

Visvader JE, Lindeman GJ. Transcriptional regulators in mammary gland development and cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003; 35(7): 1034-51.

Vo N, Goodman RH. CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 2001; 276(17): 13505-8.

Vorbach C, Capecchi MR, Penninger JM. Evolution of the mammary gland from the innate immune system? *Bioessays*. 2006; 28(6): 606-16.

W

Walton KD, Wagner KU, Rucker EB 3rd, Shillingford JM, Miyoshi K, Hennighausen L. Conditional deletion of the *bcl-x* gene from mouse mammary epithelium results in accelerated apoptosis during involution but does not compromise cell function during lactation. *Mech Dev*. 2001; 109(2): 281-93.

Wang C, Chen Q, Hamajima Y, Sun W, Zheng YQ, Hu XH, et al. Id2 regulates the proliferation of squamous cell carcinoma in vitro via the NF- κ B/Cyclin D1 pathway. *Chin J Cancer*. 2012; 31(9): 430-9.

Wang S, Sdrulla A, Johnson JE, Yokota Y, Barres BA. A role for the helix-loop-helix protein Id2 in the control of oligodendrocyte development. *Neuron*. 2001; 29(3): 603-14.

Wang X, Kiyokawa H, Dennewitz MB, Costa RH. The Forkhead Box m1b transcription factor is essential for hepatocyte DNA replication and mitosis during mouse liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(26): 16881-6.

Watson CJ. Involution: apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland from milk factory to a quiescent organ. *Breast Cancer Res*. 2006a; 8(2):203.

Watson CJ. Post-lactational mammary gland regression: molecular basis and implications for breast cancer. *Expert Rev Mol Med*. 2006b; 8(32): 1-15.

Watson CJ, Kreuzaler PA. Remodeling mechanisms of the mammary gland during involution. *Int J Dev Biol*. 2011; 55(7-9): 757-62.

Weinstein M, Monga SP, Liu Y, Brodie SG, Tang Y, Li C, et al. Smad proteins and hepatocyte growth factor control parallel regulatory pathways that converge on beta1-integrin to promote normal liver development. *Mol Cell Biol*. 2001; 21(15): 5122-31.

White P, Brestelli JE, Kaestner KH, Greenbaum LE. Identification of transcriptional networks during liver regeneration. *J Biol Chem*. 2005; 280(5): 3715-22.

Williams SA, Maecker HL, French DM, Liu J, Gregg A, Silverstein LB, et al. USP1 deubiquitinates ID proteins to preserve a mesenchymal stem cell program in osteosarcoma. *Cell*. 2011; 146(6): 918-30.

Wilkinson KD. Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *FASEB J*. 1997; 11(14): 1245-56.

Wiesen J, Werb Z. Proteinases, cell cycle regulation, and apoptosis during mammary gland involution (minireview). *Mol Reprod Dev*. 2000; 56(4): 534-40.

Wolff B, Naumann M. INK4 cell cycle inhibitors direct transcriptional inactivation of NF-kappaB. *Oncogene*. 1999; 18(16): 2663-6.

Wollenberger A, Ristau O, Schoffa G. [A simple technic for extremely rapid freezing of large pieces of tissue]. *Pflugers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere*. 1960; 270: 399-412.

Wrana JL. Crossing Smads. *Sci STKE*. 2000; 2000(23): re1

X

Xiao G, Fong A, Sun SC. Induction of p100 processing by NF-kappaB-inducing kinase involves docking IkappaB kinase alpha (IKKalpha) to p100 and IKKalpha-mediated phosphorylation. *J Biol Chem*. 2004; 279(29): 30099-105.

Y

Yaginuma K, Koike K. Identification of a promoter region for 3.6-kilobase mRNA of hepatitis B virus and specific cellular binding protein. *J Virol*. 1989; 63(7): 2914-20.

Yamada KM, Miyamoto S. Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Curr Opin Cell Biol*. 1995; 7(5): 681-9.

Yamaguchi Y, Shibata H, Handa H. Transcription elongation factors DSIF and NELF: promoter-proximal pausing and beyond. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1829(1): 98-104.

Yap AS, Brieher WM, Gumbiner BM. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1997; 13: 119-46.

Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, et al. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J.* 2004; 23(12): 2369-80.

Yokota Y. Id and development. *Oncogene.* 2001; 20(58): 8290-8.

Yokota Y, Mori S. Role of Id family proteins in growth control. *J Cell Physiol.* 2002; 190(1): 21-8.

Yokota Y, Mansouri A, Mori S, Sugawara S, Adachi S, Nishikawa S, et al. Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nature.* 1999; 397(6721): 702-6.

Z

Zaragozá R, García-Trevijano ER, Miralles VJ, Mata M, García C, Carmena R, et al. Role of GSH in the modulation of NOS-2 expression in the weaned mammary gland. *Biochem Soc Trans.* 2005; 33(6): 1397-8.

Zaragozá R, Gimeno A, Miralles VJ, García-Trevijano ER, Carmena R, García C, et al. Retinoids induce MMP-9 expression through RARalpha during mammary gland remodeling. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 292(4): 1140-8.

Zaragoza R, Torres L, García C, Eroles P, Corrales F, Bosch A, et al. Nitration of cathepsin D enhances its proteolytic activity during mammary gland remodelling after lactation. *Biochem J.* 2009; 419(2): 279-88.

Zaragoza R, Bosch A, García C, Sandoval J, Serna E, Torres L, et al. Nitric oxide triggers mammary gland involution after weaning: remodelling is delayed but not impaired in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Biochem J.* 2010; 428(3): 451-62.

Zebedee Z, Hara E. Id proteins in cell cycle control and cellular senescence. *Oncogene.* 2001; 20(58): 8317-25.

Zhang X, Odom DT, Koo SH, Conkright MD, Canetti G, Best J, et al. Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(12): 4459-64.

Zhong H, Voll RE, Ghosh S. Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell.* 1998; 1(5): 661-71.

Zhong H, SuYang H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S. The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by the IkappaB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell.* 1997; 89(3): 413-24.

Zilberfarb V, Siquier K, Strosberg AD, Issad T. Effect of dexamethasone on adipocyte differentiation markers and tumour necrosis factor- α expression in human PAZ6 cells. *Diabetologia*. 2001; 44(3): 377-86.

Zubair A, Frieri M. Role of nuclear factor- κ B in breast and colorectal cancer. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2013; 13(1): 44-9.

