

ESTUDIO DE INHIBIDORES DE SIRTUINAS COMO FUTUROS AGENTES ANTITUMORALES

**Memoria que presenta Ester Lara Martín para optar al grado de
Doctor**

Ester Lara Martín

Departamento de Biología

Director de Tesis: Dr. Mario Fernández Fraga

2009



Dr. Mario Fernández Fraga, Doctor en Bioquímica, Científico Titular del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC),

CERTIFICA

que el trabajo titulado “Estudio de inhibidores de Sirtuinas como futuros agentes antitumorales” que presenta Ester Lara Martín para la obtención del grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid ha sido realizado bajo su dirección en el laboratorio de Epigenética del Cáncer del CNIO (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas) y en el Departamento de Inmunología y Oncología del CNB (Centro Nacional de Biotecnología) y reúne, a su juicio, la calidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, expide el presente certificado en Madrid a 17 de Noviembre de 2009.

Dr. Mario F. Fraga

Esta tesis doctoral ha sido financiada por el Fondo de Investigación Sanitaria (Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo).

ÍNDICE

ABREVIATURAS	10
RESUMEN (en castellano)	16
RESUMEN (Abstract, en inglés)	17
INTRODUCCIÓN	
1. Definición de Epigenética	20
2. Metilación del DNA	23
3. Organización nuclear. Histonas.....	25
4. Modificaciones post-traduccionales de histonas.....	28
4.1 Metilación	30
4.2 Fosforilación	32
4.3 Ubiquitinación	33
4.4 Biotinilación	33
4.5 Sumoilación	34
4.6 ADP Ribosilación.....	34
4.7 Isomerización	34
4.8 Deiminación.....	35
4.9 Acetilación	35
4.9.1 Histona acetiltransferasas (HATs)	37
4.9.2 Histona desacetilasas (HDACs)	37
4.9.2.1 Tipos	37
4.9.2.2 Funciones.....	39
4.9.2.3 HDACs y cáncer	40
5. Sirtuinas	41
5.1 Sirt1	43
5.1.1 Regulación de la expresión de Sirt1	45
5.2 Sirt2	47
5.3 Sirt3, Sirt4 y Sirt5.....	48
5.4 Sirt6	49
5.5 Sirt7	49
5.6 Sirtuinas y cáncer	50
6. Inhibidores de desacetilasas de histona clásicas (HDACi).....	52
7. Inhibidores de Sirtuinas	55
OBJETIVOS	60

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material	
1.1 Inhibidores de Sirtuinas.....	64
1.2 Líneas celulares	65
2. Métodos	
2.1 Inhibición <i>in vitro</i> de Sirt1 y Sirt2.....	66
2.2 Cultivo y tratamientos de las líneas celulares con inhibidores de Sirtuinas	67
2.3 Reactivación de la expresión génica mediante tratamiento con 5-aza-2'-desoxicitidina (AZA) y Tricostatina A (TSA)	67
2.4 Ensayo de viabilidad celular.....	67
2.5 Estudio de apoptosis y ciclo celular por citometría de flujo ...	68
2.6 Ensayo de inhibición de la expresión génica por RNA pequeño de interferencia (siRNA)	69
2.7 Ensayo de tolerabilidad <i>in vivo</i> en ratones inmunodeprimidos	70
2.8 Western Blotting (WB).....	70
2.9 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	72
2.10 Electroforesis capilar de alta resolución (HPCE).....	72
2.11 Espectrometría de masas <i>top-down</i>	72
2.12 Espectrometría de masas en tándem ESI-MS/MS (<i>electrospray ionization tandem mass spectrometry</i>)	73
2.13 Cuantificación de la expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real	73
2.14 Estudio de la expresión génica mediante tarjetas microfluídicas (LDA, <i>low density array</i>).....	74
2.15 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChiP).....	75
2.16 ChiP cuantitativo.....	76
2.17 Secuenciación de bisulfito.....	77
2.18 Pirosecuenciación	78

RESULTADOS

A) Estudio previo de un panel de compuestos inhibidores de Sirtuinas	
1. Inhibición <i>in vitro</i> de la actividad enzimática de Sirt1 y Sirt2 ...	82
2. Estudio de la apoptosis celular	83
3. Efectos en la diferenciación celular de la línea U937	84
4. Efectos sobre la viabilidad celular.....	85
5. Resumen	91
B) Caracterización de Salermide como posible agente antitumoral	
1. Análisis estructural del mecanismo de inhibición de Sirtuinas por Salermide	92
2. Síntesis de Salermide	93
3. Inhibición <i>in vitro</i> de Sirt1 y Sirt2 mediada por Salermide	94
4. Efectos de Salermide sobre la viabilidad celular	96
5. Efectos de Salermide sobre el ciclo celular de MOLT4	101
6. Efectos de Salermide sobre la morfología celular de líneas tumorales	103
7. Ensayo de tolerabilidad en ratones inmunodeprimidos	105
8. Estudio de las vías apoptóticas que median en el efecto de Salermide.....	105
9. Estudio de inducción de apoptosis mediada por inhibición de Sirt2	106
10. Estudio de inducción de apoptosis mediada por inhibición de Sirt1	111
11. Estudio de la expresión de Sirt2 en tumores	120
11.1 Metilación del promotor de Sirt2.....	123
11.2 Acetilación de histonas a nivel del promotor de Sirt2...	126

DISCUSIÓN

1. Evaluación de los efectos antiproliferativos y apoptóticos de los compuestos inhibidores de Sirtuinas	132
2. Evaluación <i>in vivo</i> de los efectos de Salermide sobre el crecimiento tumoral	134

3. Caracterización de la actividad apoptótica mediada por Salermide.....	135
4. El papel de Sirt1 en cáncer	137
5. Expresión de Sirt2 en tumores y sus consecuencias en la actividad mediada por Salermide.....	140
CONCLUSIONES	146
BIBLIOGRAFÍA	150
ANEXOS	
Publicaciones relacionadas con la Tesis Doctoral	168
Publicaciones no relacionadas con la Tesis Doctoral	210

ABREVIATURAS

AcK16H4: lisina 16 acetilada de la histona H4
ADP: adenosin difosfato
ALU: short interspersed nuclear element
APC: Adenomatous polyposis coli protein
AROS: Active regulator of SIRT1
ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated protein
ATP: adenosina trifosfato
ATR: ATM-related protein
Bdf1: Bromodomain factor 1 protein
BER: base excision-repair pathway
BRCA1: Breast cancer type 1 susceptibility protein
ChiP: inmunoprecipitación de la cromatina
ChK2: Serine/threonine-protein kinase
CpG: dinucleótido citosina guanina
CPS1: Carbamoyl-phosphate synthetase I
CR: calorie restriction
DBC1: deleted in breast cancer 1
DMSO: dimetilsulfóxido
DNA: ácido desoxirribonucleico
DNAc: DNA complementario
DNAr: DNA ribosómico
DNMT: metiltransferasa del DNA
DOT-1: Disrupter of telomeric silencing-1
E2F: Electro-acoustic 2 Factor
EGFR: Epidermal growth factor receptor
eNOS: Nitric oxide synthase, endothelial
FOXO: Forkhead box protein
FPR: Formylpeptide receptor protein
GADD45a: Growth arrest and DNA-damage-inducible alpha
GCIP: Grap2 and cyclin-D-interacting protein
GDH: Glucose 1-dehydrogenase
H1C1: hypermethylated in cancer 1 gene
HAT: acetiltransferasa de histona

HCS: holocarboxilasa sintetasa
HDAC: desacetilasa de histona
HDACi: inhibidor de HDAC
HMT: metiltransferasa de histona
HOX: homeobox genes, genes homeóticos
HP1: heterochromatin protein 1
HPCE: electrophoresis capilar de alta resolución
HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
HuR: Hu-antigen R protein
ICF: Centromere instability and Facial anomalies syndrome
IGF2: Insulin-Like Growth Factor 2
IP: yoduro de propidio
Jmj: jumonji
Ku-70: ATP-dependent DNA helicase II 70 kDa subunit
K4H3: lisina 4 de la histona H3
LDA: low density array
LINE1, L1: Long interspersed nucleotide element-1
LSD1: Lysine-specific histone demethylase 1
MART: mono-ADP- ribosiltransferasa
MBD: Methyl-Binding Domain
MeCP: Methyl-CpG-Binding Protein
meK9H3: lisina 9 metilada de la histona H3
MGMT: 6-O-methylguanine-DNA methyltransferase
MRN: Mre11/Rad50/Nbs1 complex
MS: espectrometría de masas
MSK: mitogen and stress- activated protein kinase
MyoD: myogenic differentiation factor D
NAD⁺: dinucleótido de nicotinamida adenina
NADH: forma reducida del NAD⁺
Namp1: nicotinamida fosfo-ribosil transferasa
NcoR/SMRT: Nuclear receptor corepressor/Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor
NF-κB: Nuclear factor-κB

PARP: poli-ADP-ribosa polimerasa

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PGC1- α : Peroxisome proliferator-activated receptor alfa coactivator 1

PHD: Plant Homeo Domain

PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor γ

PS2: estrogen-responsive gene

Rb: retinoblastoma protein

RNA: ácido ribonucleico

RNA_m: RNA mensajero

RNA_r: RNA ribosómico

RNF: RING finger protein

S10H3: serina 10 de la histona H3

SAM: S-adenosylmethionine

SDS: dodecil sulfato sódico

SENP1: SUMO-specific protease 1

SET: Supressor of variegation-Enhanser of zeste-Trithorax domain

Smad7: Mothers against decapentaplegic homolog 7

SUMO: small ubiquitin modifier

Suv39h1: Suppressor of variegation 3-9 homolog 1

Tat: Transactivating regulatory protein

TSG: tumor supressor gene

US FDA: Food and Drug Administration of United States

RESUMEN

Resumen

Sirt1 y Sirt2 son dos enzimas de la familia de desacetilasas de histonas (HDACs) de clase III (Sirtuinas), dependientes de NAD⁺, implicadas en los procesos de proliferación y diferenciación celular. Las Sirtuinas se han convertido, por lo tanto, en enzimas diana candidatas para el desarrollo de nuevas drogas antitumorales. Con el propósito de identificar un nuevo inhibidor de Sirtuinas con función antitumoral, diseñamos y sintetizamos diez compuestos que podían presentar *a priori* una acción inhibidora de la actividad enzimática de Sirt1 y/o Sirt2. Realizamos un estudio de la inhibición *in vitro* de estos compuestos sobre Sirt1 y Sirt2. Siete de los diez compuestos sintetizados presentaron una alta eficiencia de inhibición de la actividad enzimática de Sirt1 y/o Sirt2. Estudiamos la capacidad de dichos compuestos de inducir apoptosis y diferenciación celular en la línea derivada de leucemia U937 y también analizamos el efecto en la proliferación celular de líneas tumorales derivadas de mama (MDA-MB-231), colon (SW480 and RKO) y leucemia (MOLT4). Tras el análisis conjunto de los resultados procedentes de estos ensayos decidimos caracterizar en mayor profundidad la actividad antitumoral de MC1776. El compuesto MC1776, al que denominamos Salermide, presentó una alta tasa de inhibición *in vitro* de la actividad enzimática de Sirt1 y Sirt2. Además Salermide no presentó toxicidad en ratones a dosis elevadas de 100 μ M e indujo altas tasas de apoptosis específicamente en líneas tumorales. Esta inducción de apoptosis era independiente de la acetilación de α -tubulina y K16H4, lo que sugería que, *in vivo*, el efecto proapoptótico de Salermide no estaba mediado por la inhibición de Sirt2 pero que podría estar mediado por la inhibición de Sirt1. Aunque p53 se ha descrito como diana de acción de la actividad de Sirt1, nuestros resultados indicaron que el efecto proapoptótico de Salermide mediado por Sirt1 era independiente de p53. Finalmente determinamos que el efecto apoptótico de Salermide se debía a la reactivación de genes proapoptóticos epigenéticamente reprimidos por Sirt1 exclusivamente en células tumorales. Nuestros resultados, además de aportar nuevos datos que relacionan la actividad de Sirt1 en el proceso tumoral, evidencian propiedades de Salermide que permitirían su uso futuro como agente antitumoral.

Abstract

Sirt1 and Sirt2 belong to the family of NAD⁺ - dependent class III histone deacetylases and are involved in regulating lifespan because they are directly implied in proliferation and cellular differentiation. As cancer is a disease of aging, targeting Sirtuins is emerging as a promising antitumour strategy. With the purpose of identifying a novel Sirtuin inhibitor with antitumoral function, we design and sintetize ten compounds that, a priori, would inhibit efficiently the Sirtuin enzyme activity. We performed a previous study of the *in vitro* capacities of inhibit the enzymatic activities of these two Sirtuins. Seven of ten new inhibitors showed a high efficiency of *in vitro* inhibition rate of Sirt1 and/or Sirt2. Also, we determined the capacity of apoptosis and differentiation induction over leukemia cell line U937 and the effects on proliferation rate of breast cancer cell lines (MDA-MB-231), colon cancer cell line (SW480 and RKO) and leukemia cell line (MOLT4). According to the results we decided to characterize in detail the inhibitory activity of the compound MC1776 over the enzymatic activity of Sirtuins and over the cell viability in tumor cell lines. The Sirtuin inhibitor, which we named Salermide presented a strong *in vitro* inhibitory effect on Sirt1 and Sirt2. Salermide was well tolerated by mice at concentrations up to 100 μ M and prompted tumour-specific cell death in a wide range of human cancer cell lines. The antitumour activity of Salermide was primarily due to a massive induction of apoptosis. This was independent of global tubulin and K16H4 acetylation, which ruled out a putative Sirt2-mediated apoptotic pathway and suggested an *in vivo* mechanism of action through Sirtuin 1. Consistent with this, RNAi-mediated knockdown of Sirt1, but not Sirt2, induced apoptosis in cancer cells. Although p53 has been reported to be a target of Sirtuin 1, genetic p53 knockdowns demonstrated that the Sirtuin 1-dependent proapoptotic effect of Salermide is p53-independent. We were finally able to ascribe the apoptotic effect of Salermide to the reactivation of proapoptotic genes epigenetically repressed exclusively in cancer cells by Sirtuin 1. Taken together, our results underline Salermide's promise as an anticancer drug and provide evidence of the molecular mechanism through which Sirt1 is involved in human tumorigenesis.

INTRODUCCIÓN

1. Definición de Epigenética

El término Epigenética fue acuñado por Conrad Waddington en 1942 (WADDINGTON 1942) para referirse a la ciencia que estudia el establecimiento de fenotipos determinados a través de las interacciones entre los genes y sus productos. La idea de que un mismo genotipo puede dar lugar a diferentes fenotipos mediante regulación epigenética de la función génica se ha ido consolidando con el tiempo aunque la definición de Epigenética ha evolucionado sustancialmente. Antes de 2007, se consideraba a la Epigenética como el “estudio de los cambios heredables en la función génica que ocurren sin alteraciones en la secuencia del DNA”. Sin embargo, debido a que numerosos procesos de control de la expresión génica implicados en el establecimiento de fenotipos específicos durante la diferenciación celular no son heredables, en la reunión del “*NIH Roadmap for medical research*” en Mayo de 2007 se propuso que la Epigenética se refería al “estudio de las modificaciones genéticas estables que producen cambios en la expresión y función génica sin que se produzcan alteraciones en la secuencia de DNA”. Aunque esta definición es la que goza de mayor consenso dentro la comunidad científica, posteriormente, se ha propuesto que la Epigenética estudia los mecanismos moleculares implicados en el establecimiento de estados funcionales específicos de la cromatina (BIRD 2007).

Lo cierto es que durante el desarrollo normal, las células somáticas que descienden de una única célula progenitora y que contienen un genotipo similar, se diferencian para adquirir nuevas funciones y características, expresando o reprimiendo ciertos grupos de genes. Este proceso implica un gran número de modificaciones químicas que afectan al plegamiento del material genético sin afectar a la secuencia genética y que, teniendo en cuentas las definiciones anteriores, consideramos como mecanismos epigenéticos. Por tanto, los mecanismos epigenéticos están íntimamente ligados a un gran número de procesos celulares, tales como el desarrollo, la diferenciación y la respuesta celular al estrés, de tal forma que los procesos epigenéticos son indispensables para el desarrollo de organismo.

Los mecanismos epigenéticos incluyen, entre otros, la metilación del DNA, las modificaciones covalentes de las histonas, los RNAs no codificantes y la maquinaria de remodelación de la cromatina dependiente de ATP (Figura 1). Las modificaciones epigenéticas mejor conocidas son la metilación del DNA y las modificaciones covalentes post-traduccionales de las histonas. Estas modificaciones son estables, pero al mismo tiempo pueden modularse por varios factores, incluyendo circunstancias fisiológicas y patológicas celulares y determinadas condiciones ambientales a las que se ve sometido el organismo (HOLLIDAY 2006; WHITELAW and WHITELAW 2006). Así, cuanto más difieren los hábitos de vida en términos de dieta, tabaquismo, fármacos, estrés, etc., más diferencias se observan en los niveles globales de metilación del DNA y en el patrón de modificaciones de histonas en parejas de gemelos homocigotos (FRAGA *et al.* 2005a).

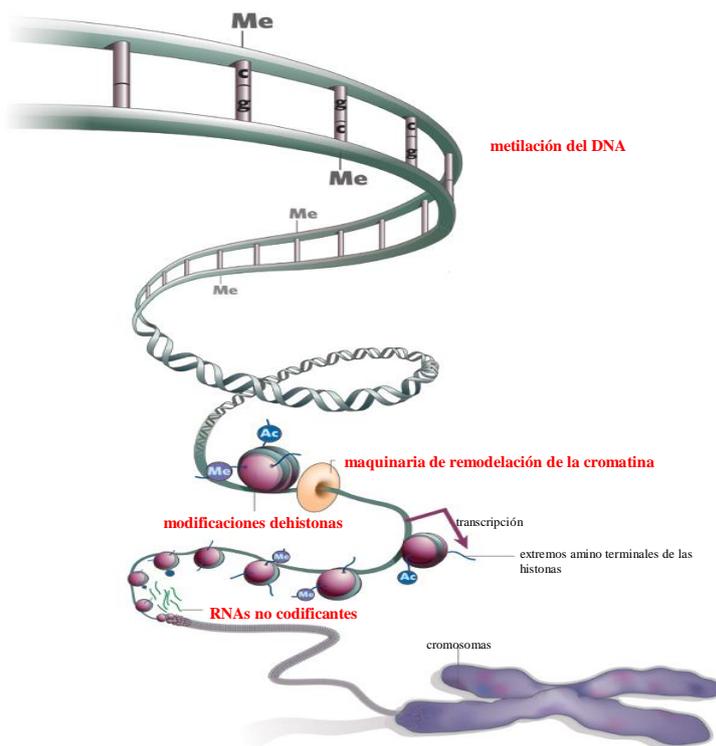


Figura 1: Mecanismos epigenéticos. La metilación del DNA y las modificaciones de histonas, junto con los RNAs no codificantes, la maquinaria de remodelación de la cromatina y la incorporación de variantes de histonas a la cromatina conforman el conjunto de mecanismos epigenéticos implicados en la regulación y expresión de los genes presentes en el DNA. Imagen modificada de AHEAD International Human Epigenome Project, 2008.

Aunque los **mecanismos epigenéticos** son fundamentales para el correcto funcionamiento del organismo, en los últimos años han adquirido un especial protagonismo por su papel en patologías como el **cáncer**. En la transformación maligna, se produce la activación de numerosos oncogenes al

mismo tiempo que un gran número de genes supresores tumorales se reprimen. Actualmente, sabemos que el proceso tumoral no está sujeto únicamente a alteraciones genéticas (mutaciones, amplificaciones y deleciones génicas, etc.), sino que también implica a alteraciones epigenéticas. De hecho, las células tumorales presentan al menos tres grandes alteraciones epigenéticas: hipometilación global del DNA, hipermetilación de genes supresores tumorales y un patrón alterado de las modificaciones de histonas (revisado en (ESTELLER 2008)).

- La **hipometilación global del DNA** se debe, sobre todo, a la hipometilación de secuencias de DNA repetitivo y a la pérdida de metilación de regiones codificantes e intrones. La hipometilación del DNA puede contribuir al desarrollo de un proceso tumoral induciendo inestabilidad cromosómica, reactivación de transposones y pérdida de *imprinting* (CUI *et al.* 2002; MOORE *et al.* 2008; WALSH and BESTOR 1999).

- Los **genes supresores tumorales afectados por hipermetilación** están implicados en procesos de regulación del ciclo celular, adhesión celular, reparación del DNA, apoptosis, angiogénesis, y en general, en cualquier proceso que de una forma u otra afecte al desarrollo de cáncer. El patrón de hipermetilación de estos genes es específico del tipo tumoral y puede ocurrir en diferentes etapas del desarrollo tumoral. La inactivación de estos genes podría proporcionar una ventaja en la proliferación celular y desarrollo del tumor. El primer gen supresor tumoral (TSG, *tumor suppressor gene*) en el que se describió hipermetilación fue en el gen *Rb* (*retinoblastoma tumor-suppressor gene*) (GREGER *et al.* 1989), y después relacionó hipermetilación con inactivación de TSGs en muchos otros, *p16^{INK4a}* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) *BRCA1* (*breast cancer susceptibility gene 1*), *MGMT* (*O6-methylguanine-DNA methyltransferase*), etc. (DOBROVIC and SIMPFENDORFER 1997; ESTELLER *et al.* 1999; ICHIKAWA *et al.* 1996).

- Existen combinaciones particulares de **modificaciones de histonas** que se han asociado al cáncer. En tumores humanos se ha descrito una pérdida progresiva de la forma monoacetilada de la Lys16 y trimetilada de la Lys20 de la histona H4 que ocurre durante el desarrollo del cáncer (FRAGA *et al.* 2005b). Seligson *et al.* (SELIGSON *et al.* 2005) asociaron combinaciones

particulares de modificaciones de histonas como un factor pronóstico del grado de malignidad de cáncer de próstata. Además se ha establecido una interrelación entre la hipermetilación de promotores de TSGs y ciertas modificaciones de histonas (pérdida de trimetilación de K4H3 y aumento de metilación de K27H3 y K9H3) que conducen a un silenciamiento génico (FAHRNER *et al.* 2002).

2. Metilación del DNA

La metilación del DNA es una modificación covalente del DNA que no modifica su secuencia nucleotídica pero que, sin embargo, puede tener una gran influencia sobre la regulación de la expresión génica. La metilación del DNA consiste en la adición de un grupo metilo al anillo aromático de una base del DNA. En eucariotas, este grupo metilo se incorpora a la posición C-5 de las citosinas pertenecientes a los dinucleótidos CpG (BIRD 2002; ROBERTSON and JONES 2000). En tejidos humanos sanos, las citosinas metiladas conforman del 3-6% del total de citosinas del genoma (CALLINAN and FEINBERG 2006). Las regiones del genoma en donde están concentrados los dinucleótidos CpG se llaman islas CpG. Las islas CpG son regiones de más de 500 pb con un porcentaje de C+G superior al 55% y están localizadas en la zona promotora de aproximadamente un 40% de los genes en mamíferos. Estas islas normalmente no están metiladas, pero bajo determinadas circunstancias se hipermetilan, lo que conlleva al silenciamiento del gen al que están asociadas. Sólo una pequeña proporción de la metilación global del genoma se debe a la metilación de promotores, ya que la mayor parte de los dinucleótidos CpG metilados se localizan en las secuencias repetitivas, como retrovirus endógenos, elementos L1 y ALU (COLOT *et al.* 1999; YODER *et al.* 1997). La metilación en estas secuencias las mantiene silenciadas, dificultando así, nuevos procesos de amplificación e inserción en el genoma (CALLINAN and FEINBERG 2006). De hecho, se ha propuesto que la metilación del DNA se ha desarrollado como un mecanismo de defensa para prevenir la inestabilidad cromosómica, las translocaciones y la interrupción génica causada por la reactivación de estos transposones (YODER *et al.* 1997).

La relación entre **metilación del DNA y represión génica** podría establecerse de forma directa e indirecta.

- Estaría implicada directamente ya que al incorporarse la citosina metilada al surco mayor de la doble hélice de DNA, los factores de transcripción no podrían acceder a su centro activo y no se iniciaría el proceso de transcripción génica (COMB and GOODMAN 1990; IGUCHI-ARIGA and SCHAFFNER 1989). Además la metilación del DNA puede dificultar el proceso de elongación de la transcripción reduciendo la accesibilidad de la RNA polimerasa II (LORINCZ *et al.* 2004).

- La metilación estaría implicada indirectamente con un silenciamiento génico mediante el reclutamiento de proteínas portadoras de un dominio MBD (*methyl-binding domain*) al promotor génico (DEANGELIS *et al.* 2008). La unión de estas proteínas al DNA metilado dificultaría el acceso y unión de los factores de transcripción o bien, podría inhibir la transcripción remodelando la estructura cromatínica mediante su incorporación a complejos remodeladores de la cromatina (WADE *et al.* 1999).

Además de la implicación de la metilación del DNA en procesos de expresión génica y silenciamiento de secuencias repetitivas de elementos transponibles, centrómeros y telómeros, la metilación del DNA está implicada de forma directa en fenómenos de *imprinting* genómico e inactivación del cromosoma X en las hembras de mamíferos (REIK *et al.* 2001).

La metilación es un proceso dinámico y reversible. El patrón de metilación no se mantiene constante a lo largo de la vida de un individuo, sino que sufre sucesivas modificaciones. En mamíferos, los cambios en el patrón de metilación más importantes se producen durante el desarrollo embrionario, en donde, después de la fecundación, se eliminan los patrones de metilación previamente establecidos y se establece un nuevo patrón de metilación necesario para la expresión específica de tejido de ciertos genes, para la inactivación del cromosoma X en hembras y para el *imprinting* genómico.

La reacción de metilación del DNA está catalizada por dos tipos de metiltransferasas de DNA (DNMTs): *de novo* y de mantenimiento.

- **Metilación *de novo*** es la metilación de secuencias no metiladas para establecer un nuevo patrón de metilación. La metilación *de novo* del DNA está

catalizada por las enzimas DNMT3A y DNMT3B y se produce en su mayor parte durante el desarrollo embrionario, aunque también se produce en los puntos de integración de DNA viral en el genoma (OKANO *et al.* 1999) y durante el envejecimiento (ONO *et al.* 1989). Actualmente se propone que la metilación *de novo* de una secuencia es precedida por la metilación de la Lys 9 de la histona H3 de los nucleosomas adyacentes (BACHMAN *et al.* 2003), lo que sugiere que la metilación juega un papel importante en la estabilización de secuencias silenciadas por ciertas las modificaciones de histonas.

- **Metilación de mantenimiento** es el proceso mediante el cual se mantiene el patrón de metilación después de la replicación. Cada ronda de replicación genera una cadena de DNA de nueva síntesis no metilada frente a la cadena usada como molde, que sí está metilada. La DNMT de mantenimiento, llamada DNMT1, es la más abundante en las células somáticas y es la responsable de la propagación de la metilación del DNA con una extrema fidelidad durante el proceso de replicación del DNA (GOLL and BESTOR 2005).

- La **desmetilación** es el proceso que permite eliminar los patrones de metilación previos. Se lleva a cabo en el genoma paterno durante la fertilización (MAYER *et al.* 2000; OSWALD *et al.* 2000) y en el genoma materno durante las divisiones celulares que acompañan al desarrollo del cigoto (LI 2002). Esta desmetilación va seguida de un incremento generalizado de metilación en todo el genoma. Existen distintos tipos de enzimas que pueden catalizar la reacción de desmetilación del DNA: Oxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato, Metiltransferasas de DNA y Glicosilasas de DNA (KARKHANINA *et al.* 2009; ZHU 2009), sin embargo, el mecanismo preciso todavía no se conoce completamente.

3. Organización nuclear. Histonas

El DNA de los organismos eucariotas se encuentra en el interior del núcleo celular interaccionando con proteínas que regulan su función. La cromatina es la estructura en la cual el DNA está empaquetado dentro del núcleo celular. Está constituida por DNA y proteínas, entre las que destacan las

histonas. La unidad fundamental de la cromatina es el **nucleosoma**, que está compuesto por 147 pb de DNA que rodean, dando aproximadamente 1'7 vueltas a un octámero de histonas formado por 2 dímeros de las histonas H3 y H4 y un tetrámero de histonas H2A y H2B (LUGER *et al.* 1997; NAPPER *et al.* 2005; RICHMOND and DAVEY 2003).

Existen varios **niveles de compactación** de la cromatina. El nivel más básico es el conformado por los nucleosomas separados entre sí por una porción de DNA (DNA espaciador) de longitud variable entre 10-90 pb que garantiza la flexibilidad de la fibra de cromatina. A este primer nivel se le llama estructura primaria de la cromatina o fibra de 11 nm de diámetro con estructura de "collar de cuentas". La histona de unión H1 se puede unir al DNA espaciador permitiendo un mayor grado de compactación, la fibra de 30nm de diámetro o estructura secundaria. Mediante interacciones entre proteínas específicas y DNA se producen los niveles superiores de compactación de la cromatina que constituyen los cromosomas

Funcionalmente la cromatina se divide en eucromatina y heterocromatina. La **eucromatina** es el estado en el que la cromatina es accesible a factores de transcripción y a la RNA polimerasa, con lo cual se asocia generalmente a un estado de transcripción génica activa. En cambio, la **heterocromatina**, mucho más compacta, se asocia a un estado de inactividad transcripcional (Hsu 1962). La heterocromatina puede ser a su vez facultativa o constitutiva. La heterocromatina facultativa está asociada a aquellos genes que han de ser reprimidos específicamente en ciertos tejidos y la constitutiva a regiones de DNA repetitivo. La formación de eucromatina o heterocromatina depende fundamentalmente del número de contactos que se establezcan entre nucleosomas. Estos contactos a su vez están influidos por distintos factores: las modificaciones post-traduccionales de histonas, la maquinaria de remodelación de la cromatina y la incorporación de variantes de histonas (BASSETT *et al.* 2009).

Las **histonas** son proteínas altamente conservadas en eucariotas, lo que sugiere que la estructura fundamental de la cromatina aparece de forma temprana en la evolución, probablemente para solucionar el problema de empaquetamiento del DNA en el núcleo celular (THATCHER and GOROVSKY

1994). Las histonas son las proteínas más abundantes que se unen al DNA en las células eucariotas. Son proteínas básicas con un peso molecular que oscila entre 11 y 20 KDa y que contienen aproximadamente un 20% de aminoácidos cargados positivamente, como la arginina y la lisina. Las células eucariotas contienen principalmente cinco tipos de histonas: la H1 o histona de unión, y las cuatro histonas nucleosómicas (H2A, H2B, H3 y H4) que conforman el octámero. Las histonas que forman parte del nucleosoma tienen una estructura similar; un dominio central y un extremo amino-terminal (N-terminal) de unos 20-35 aminoácidos. El dominio central contribuye al ensamblaje del octámero que conforma el nucleosoma, mientras que los extremos N-terminales, ricos en aminoácidos básicos, tienen funciones muy importantes en los procesos normales de replicación y transcripción, ya que pueden ser modificados post-traduccionalmente y covalentemente por enzimas específicas provocando cambios en la estructura del nucleosoma y modificando los contactos internucleosomales (ZHANG and REINBERG 2001).

Además de las histonas descritas anteriormente, existen **variantes de las histonas** que se localizan en regiones concretas de la cromatina y con características distintas a las otras que pueden alterar las propiedades del nucleosoma y regular la dinámica de la cromatina. Las variantes de histonas no se sintetizan en la fase S del ciclo celular y se incorporan a la cromatina de forma independiente a la replicación del DNA. Las diferencias entre las histonas y sus variantes pueden oscilar entre pequeños cambios en la secuencia de aminoácidos hasta cambios biofísicos importantes. La histona H1 tiene numerosas variantes (H5, variantes específicas de esperma y de testículo, etc) con funciones específicas. Algunas de ellas se han asociado a represión transcripcional durante la diferenciación celular (BUTTINELLI *et al.* 1999). La histona H2A es la que presenta un mayor número de variaciones: H2A.Z, MacroH2A, H2A.X, etc. La histona MacroH2A se localiza predominantemente en el cromosoma X inactivo y está asociada a una represión transcripcional (COSTANZI and PEHRSON 1998). La histona H2A.Z se localiza en los sitios de unión de la proteína asociada a heterocromatina HP1, con lo cual también está asociada a un estado transcripcionalmente inactivo (RANGASAMY *et al.* 2003). También se ha visto que se asocia a regiones

pericentroméricas regulando la integridad genómica (KROGAN *et al.* 2004). H2A.X se deposita a lo largo de todo el cromosoma y se fosforila por las quinasas ATM y ATR en los sitios donde hay una rotura de la doble hélice, por lo que esta histona parece ser esencial en el reclutamiento al DNA de la maquinaria de reparación del DNA (ROGAKOU *et al.* 1999). La histona H3 tiene dos variantes principales, la H3.3 y la variante centromérica que en mamíferos se llama CENP-A. H3.3 se localiza en las regiones transcripcionalmente activas del cromosoma (AHMAD and HENIKOFF 2002) y CENP-A es necesaria para una correcta segregación cromosómica (FOLCO *et al.* 2008).

La función más común y la mejor estudiada de la histonas es su implicación en la organización de la cromatina dentro del núcleo celular; sin embargo, se han relacionado también con los procesos de reparación del DNA, regulación de ciclo celular y apoptosis. La histona H1 inhibe la proliferación celular e induce apoptosis en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 (VANI *et al.* 2006), mientras que la histona H2A induce diferenciación celular y senescencia. La variante de histona H1.2 podría actuar como sensor de la rotura de la doble hélice de DNA (TH'NG *et al.* 2005) y presentar actividad antimicrobiana (JACOBSEN *et al.* 2005).

4. Modificaciones post-traduccionales de las histonas

Las modificaciones post-traduccionales de las histonas están estrechamente ligados con el proceso de regulación de la transcripción génica. Las histonas que constituyen el nucleosoma tienen una conformación predominantemente globular, a excepción de sus extremos N-terminales, que están desestructurados. Una de las particularidades de estas histonas es que pueden estar sometidas a un gran número de modificaciones covalentes. Aunque la mayor tasa de modificación reside en los extremos N-terminales, también se han descrito modificaciones en la parte globular de estas histonas (NG *et al.* 2002; VAN LEEUWEN *et al.* 2002).

Gracias a la espectrometría de masas y al uso de anticuerpos específicos se han descrito al menos ocho modificaciones diferentes de histonas localizadas en más de 60 aminoácidos distintos (Tabla 1). Estas

modificaciones son dinámicas y reversibles, que aparecen y desaparecen de la cromatina en cuestión de minutos dependiendo de las condiciones de señalización dentro de la célula.

Se ha propuesto la existencia de un “código de histonas” según el cual diferentes combinaciones de modificaciones de los extremos N-terminales de histonas afectarían de forma específica a las interacciones con otras proteínas asociadas a la cromatina relacionándose con procesos de control del ciclo celular y de replicación y reparación del DNA (JENUWEIN and ALLIS 2001). Las modificaciones de histonas pueden interrelacionar entre sí de distintas formas: una modificación puede ser antagonista de otra (por ejemplo, acetilación y metilación sobre un residuo de lisina en particular), una modificación puede interferir en la unión de una proteína a una región cercana (por ejemplo, la fosforilación de S10H3 afecta a la unión de HP1 a meK9H3) y por último, la actividad de la enzima modificadora de histona se puede ver afectada por una segunda modificación (por ejemplo, la acetiltransferasa GCN5 reconoce más fácilmente a H3 en presencia de S10H3 fosforilada). (revisado en (KOUZARIDES 2007)).

TIPO DE MODIFICACIÓN	RESIDUOS MODIFICADOS	FUNCIÓN REGULADA
ACETILACIÓN	K9H3, K14H3, K18H3, K36H3, K56H3 K5H4, K8H4, K12H4, K16H4 K5H2A, K12H2B, K15H2B	Transcripción, reparación del DNA, replicación, condensación cromosómica
METILACIÓN DE LISINAS	K4H3, K9H3, K27H3, K36H3, K79H3 K20H4	Transcripción, reparación del DNA
METILACIÓN DE ARGININAS	R2H3, R8H3, R17H3, R26H3 R3H4	Transcripción
FOSFORILACIÓN	T3H3, S10H3, S28H3 S1H4 S14H2B	Transcripción, reparación del DNA, condensación cromosómica
UBIQUITILACIÓN	K119H2A, K120H2B	Transcripción, reparación del DNA,
SUMOILACIÓN	En residuos de lisina	Transcripción
RIBOSILACIÓN	En residuos de lisina	Transcripción
DEIMINACIÓN	R2H3, R3H4	Transcripción
ISOMERIZACIÓN	P30H3, P38H3	Transcripción

Tabla 1: Tipos de modificaciones de histonas y principales funciones asociadas. Tabla modificada de (KOUZARIDES 2007).

Hay dos mecanismos de acción bien caracterizados por los cuales las modificaciones de histonas se traducen en una función celular determinada: la eliminación o relajación de las uniones entre histonas y DNA para producir un estado abierto de cromatina o eucromatina, y el otro mecanismo, relacionado con la capacidad que tienen estas modificaciones para reclutar a proteínas no

histónicas al DNA y ejercer así una función determinada. Las proteínas no histónicas se unen a estas modificaciones a través de dominios específicos de unión. La metilación de las histonas puede ser reconocida por cromodominios (PRAY-GRANT *et al.* 2005), por dominios PHD (*plant homeodomain*) (MATTHEWS *et al.* 2007), por dominios Tudor (KIM *et al.* 2006) y dominios MBT (*malignant-brain-tumor*) (MARGUERON *et al.* 2005). La acetilación de histonas es reconocida por bromodominios (MORINIERE *et al.* 2009) y la fosforilación es reconocida por dominios de la familia de proteínas 14-3-3 (Chen and Wagner 1994).

4.1 Metilación

La metilación de histonas está relacionada con los procesos de regulación de la transcripción génica, respuesta al daño genético y formación de la heterocromatina. Tiene lugar sobre residuos de lisina y arginina, que pueden ser mono- di- o trimetiladas en el caso de la lisina, y mono- o dimetilados en el de la arginina. La histona que presenta una mayor tasa de metilación es la H3, seguida de la H4. Esta metilación ocurre en las lisinas 4, 9, 27 y 36 de la histona H3, en la lisina 20 de la H4, en las argininas 2, 8, 17 y 26 de la histona H3 y en la arginina 3 de la histona H4 (MUNSHI *et al.* 2009). El extremo amino terminal de la histona H1 y sus variantes también puede estar metilado (LU *et al.* 2009).

A diferencia de la acetilación y fosforilación de histonas, la metilación parece ser más estable, lo que podría convertirla en una modificación epigenética de larga duración ligada a la conformación de la cromatina (JENUWEIN and ALLIS 2001).

Las enzimas que catalizan la adición de un grupo metilo a las argininas y/o lisinas de las histonas se llaman **metiltransferasas de histonas** (HMTs) y son enzimas muy específicas que modifican normalmente a un determinado residuo de una histona en particular. Estas enzimas contienen una secuencia de 130 aminoácidos muy conservada llamada dominio SET y utilizan SAM (S-adenosil-metionina) como donante del grupo metilo. Hay dos clases de HMT dependiendo de su especificidad: las que metilan específicamente a las lisinas se llaman K-HMT, y las que metilan argininas, R-HMT o PRMT (ZHANG and

REINBERG 2001). Además, en levaduras se ha descrito una tercera clase que contiene a la proteína DOT-1 (*disrupter of telomeric silencing*), que actúa solo cuando la H3 está empaquetada en el nucleosoma y tiene un papel directo en el silenciamiento telomérico (KHAN and HAMPSEY 2002).

La **desmetilación de histonas** la llevan a cabo enzimas portadoras de dominios desmetilasa. Existen dos tipos de dominios que catalizan la reacción de desmetilación en las lisinas: el dominio LSD1 (*Lysine-specific histone demethylase 1*) y el dominio Jmj (*jumonji*). LSD1, que fue la primera desmetilasa de histonas caracterizada (SHI *et al.* 2004), cataliza la reacción de desmetilación de la Lys 4 de la histona H3 y conduce a un estado de represión transcripcional. El dominio Jmj fue identificado en ratón como una proteína con funciones importantes durante el desarrollo embrionario (TAKEUCHI *et al.* 1995). JMJD2A, que contiene un dominio Jmj, actúa desmetilando la lisina 9 y 36 de la histona H3 y otros miembros de la subfamilia JMJD2 desmetilan la Lys 9 de la histona H3 (CHEN *et al.* 2006). Sin embargo, aún no se han identificado enzimas que catalicen la desmetilación en los residuos de arginina metilados en las histonas.

Funciones asociadas a la metilación de histonas

Existen tres sitios de metilación en las histonas que están bien caracterizados como activadores de la transcripción: 3meK4H3, 3meK36H3 y 3meK79H3. En levadura, la modificación 3meK4H3 se localiza hacia el extremo 5' de los genes activos, asociándose con la RNA polimerasa II durante la iniciación de la transcripción (NG *et al.* 2003). La 3meK36H3 se acumula en la región 3' de los genes activos, asociándose con la RNA polimerasa II durante el proceso de elongación (KOUZARIDES 2007). La trimetilación de K79H3 por la metiltransferasa DOT1L se relaciona también en las con una actividad transcripcional (STEGER *et al.* 2008). Por el contrario, otras tres metilaciones específicas de histonas se han asociado con una represión transcripcional: K9H3, K27H3 y K20H4. La metilación de la K9H3 está implicada en el silenciamiento génico y en la formación de heterocromatina por reclutamiento de la proteína HP1 a los promotores de los genes reprimidos (ESKELAND *et al.* 2007). La metilación de la K27H3 está implicada en el silenciamiento génico de HOX y en la inactivación del cromosoma X (ROUGEULLE *et al.* 2004). La

metilación de la K20H4 está asociada a la formación de heterocromatina y a la reparación del DNA (SANDERS *et al.* 2004). Sin embargo, la metilación de histonas en los residuos de arginina, se pueden asociar tanto a activación como a represión génica, dependiendo de las enzimas que se recluten a los promotores (LEE *et al.* 2005).

4.2 Fosforilación

La fosforilación de histonas se lleva a cabo sobre residuos de treonina y serina y se ha relacionado con el control transcripcional y mitótico. Es un proceso mediado por diferentes quinasas (MSK1, MSK2...) en el que está implicado múltiples vías de señalización celular. La fosforilación de las histonas H1 y H3 tiene papeles importantes en la regulación transcripcional, sobretodo en respuesta rápida a algunos genes como *c-jun*, *c-fos* y *c-myc* (CHADEE *et al.* 1999; MAHADEVAN *et al.* 1991), y en la mitosis (WEI *et al.* 1999). La fosforilación de la histona H1 aumenta la tasa de disociación de la cromatina *in vivo*, favoreciendo así la transcripción génica (DOU *et al.* 2002; DOU and GOROVSKY 2002; DOU *et al.* 2005). La fosforilación de H1 también está implicada en la progresión del ciclo celular; los niveles de fosforilación de H1 son bajos en la fase G1 del ciclo celular y van aumentando a lo largo de la progresión del ciclo, existiendo niveles máximos de fosforilación cuando los cromosomas están condensados durante la mitosis y meiosis (HOHMANN 1983; HOHMANN *et al.* 1983). La fosforilación de la Ser10 de la histona H3, que está mediada por las quinasas de la familia aurora (Aurora-A y B en mamíferos), se ha asociado a genes transcripcionalmente activos (ALLISON and MILNER 2003). Esta modificación covalente tiene un papel muy importante en la reparación del DNA. La variante de la histona H2A, la H2AX, se fosforila en el extremo carboxilo terminal como respuesta a la rotura de la doble hélice de DNA producida por radiaciones y colabora en el reclutamiento de enzimas reparadoras del DNA (CELESTE *et al.* 2003; FURUTA *et al.* 2003).

4.3 Ubiquitinación

La ubiquitinación de histonas la llevan a cabo las enzimas denominadas ubiquitinasas (Bmi, RNF...) sobre los residuos de lisina. Aún no está clara la asociación de esta modificación con un estado transcripcional activo o inactivo, ya que se han visto resultados en ambas direcciones. La ubiquitinación de K119H2A llevada a cabo por las proteínas Bmi1 (*Bmi1 polycomb ring finger oncogene*)/Ring1A (*ring finger protein*) se ha asociado con represión transcripcional (CAO *et al.* 2005), mientras que la ubiquitinación de la K120H2B mediada por RNF20 (*ring finger protein 20*)/RNF40 (*ring finger protein 40*) y UbcH6 (*ubiquitin-conjugating enzyme E2E1; UBC4/5 homolog yeast*) se asocia con activación (ZHU *et al.* 2005). Además, la monoubiquitinación de la H2A se ha relacionado con la reparación del DNA (ZHU *et al.* 2009) y con los procesos de mitosis y meiosis (ROBZYK *et al.* 2000). No parece que haya una señal para la degradación de esta modificación (HERSHKO 1983; WU *et al.* 1981), que podrá actuar como señal de reconocimiento de factores reguladores y/o actuar sinérgicamente con otras modificaciones de histonas (LI *et al.* 1993).

4.4 Biotinilación

La biotinilación o incorporación de biotina a las histonas es una reacción catalizada por dos clases de enzimas: la biotinilasa, que usa lisina biotinilada como sustrato, y la holocarboxilasa sintetasa (HCS), que usa como sustrato biotina y ATP (CAMPOREALE *et al.* 2004; NARANG *et al.* 2004). Se han identificado varios sitios de biotinilación, la K4, K9 y K18 de la H3 y la K8 y K12 de la H4 (CAMPOREALE *et al.* 2004). Aún no se sabe mucho sobre las implicaciones que puede tener la biotinilación de histonas en los procesos celulares. Se ha relacionado con silenciamiento transcripcional y reparación del DNA (PETERS *et al.* 2002) y se ha observado que pequeños cambios en la biotinilación pueden afectar a otras modificaciones de histonas, tales como acetilación y metilación (KOTHAPALLI *et al.* 2005).

4.5 Sumoilación

La sumoilación es la incorporación de un grupo SUMO (*Small Ubiquitin Modifier*) de forma covalente a residuos de lisina de las histonas. Esta modificación puede ocurrir sobre cualquiera de las histonas que conforman en nucleosoma. La sumoilación antagoniza con la acetilación y la ubiquitilación sobre en el mismo residuo de Lys, estando relacionada por lo tanto con una represión génica (NATHAN *et al.* 2006).

4.6 Ribosilación

Las histonas pueden estar mono- o poli-ribosiladas con ADP (adenosín difosfato) en los residuos de lisina mediante 2 tipos de enzimas, las que catalizan la reacción de mono-ribosilación denominadas MARTs (*mono-ADP-ribosyltransferases*), y las que catalizan la reacción de poli-ribosilación, las enzimas PARPs (*poly-ADP-ribosyltransferases*) (SCHUETZ *et al.* 2007). Esta modificación se ha relacionado con la transcripción génica. La rotura de la doble hélice induce los mecanismos de reparación celular y produce un aumento en los niveles de histona poli-ribosilada gracias a un incremento en la actividad de PARP-1, activando la transcripción génica de *PS2* (*estrogen-responsive gene*) (JU and ROSENFELD 2006).

4.7 Isomerización

La isomerización de residuos de prolina de las histonas es un proceso reversible mediado por la mayoría de isomerasas que catalizan la formación de *cis*-prolina y *trans*-prolina. Es una modificación no covalente que regula la transcripción mediante su cooperación con la metilación de las lisinas (KOUZARIDES 2007). En levaduras se ha descrito la enzima FPR4 (*Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase; PPIase; proline isomerase*), capaz de isomerizar P38H3. Esta isomerización es la responsable de que la metiltransferasa Set2 sea capaz de reconocer y metilar a K36H3, promoviendo así los mecanismos de activación transcripcional (CHEN *et al.* 2006).

4.8 Deiminación

La deiminación de histonas se lleva a cabo sobre los residuos de arginina, que son convertidos en citrulina. El proceso de deiminación antagoniza con el de metilación de residuos de arginina de las histonas, previniendo así la activación transcripcional mediada por la metilación de argininas (CUTHBERT *et al.* 2004).

4.9 Acetilación

La acetilación de las histonas tiene lugar sobre los residuos de lisina y es la modificación covalente más estudiada. Está implicada en el control transcripcional y en la reparación de daños en el DNA (ZHAO *et al.* 2008). La acetilación de histonas es un proceso relacionado con una transcripción génica activa, mientras que la desacetilación de histonas está asociada con un estado más compacto de la cromatina y un silenciamiento transcripcional. En las células eucariotas la mayor parte del genoma está constituido por cromatina transcripcionalmente inactiva cuyas histonas presentan hipoacetilación.

La incorporación de un grupo acetilo al grupo amino de una lisina tiene efectos sobre la cromatina a dos niveles. En primer lugar, la acetilación neutraliza la carga positiva del grupo amino de la lisina, por lo cual las interacciones entre la carga positiva de la histona y la negativa del DNA se hacen más débiles, por lo que aumenta la accesibilidad de distintas proteínas, entre las que se incluyen factores de transcripción, al DNA nucleosómico. En segundo lugar, la acetilación es reconocida por proteínas portadoras de un dominio específico, el bromo-dominio. Estas proteínas pueden ser factores de transcripción o proteínas implicadas en el remodelaje de la cromatina dependiente de ATP.

En la mayoría de las especies los principales residuos donde se produce acetilación son las lisinas 9, 14, 18 y 23 de la histona H3 y las lisinas 5, 8, 12 y 16 de la histona H4 (BJERLING and EKWALL 2002). La acetilación de las histonas H3 y H4 tiene distintas funciones. La acetilación de la H3 parece estar implicada en la regulación de la expresión génica, mientras que la acetilación

de la histona H4 depende del ciclo celular, siendo más abundante en fase S, por lo que parece tener un papel en la incorporación de histonas al DNA recién replicado y en la estructura de la cromatina (AGRICOLA *et al.* 2006). Por todo ello, no es de extrañar que la histona H3 tenga mucha mayor densidad que la H4 en número de modificaciones post-traduccionales, además de presentar más variantes de histonas que la H4 (MARGUERON *et al.* 2005).

La Lys 16 de la histona H4 (K16H4) es el residuo que aparece acetilado con más frecuencia (entre un 40 y un 60% de la H4) en las células de mamífero. Esta modificación está asociada a un estado transcripcional activo (SCHER *et al.* 2007) y es la primera de los 4 residuos de lisina de la cola N-terminal de H4 en ser acetilado, seguido de la K12 y K5/K8. La acetilación de K16H4 (AcK16H4) está implicada en la regulación de la topología del DNA (CHIANI *et al.* 2006) y en la inhibición de la formación de la fibra de 30nm de DNA (SHOGREN-KNAAK *et al.* 2006). La acetilación de la K16H4 está implicada en el estado abierto y activo de la cromatina y está asociada a otras modificaciones de histonas tales como: acetilación de K12H4, K9H3, K11H2B, K16H2By 3meK4H3 (KURDISTANI *et al.* 2004). Sin embargo esta modificación antagoniza con las siguientes: 3meK9H3, 3meK27H3, meK20H4 (VAQUERO *et al.* 2004) y con la sumoilación de la H4 (HUANG *et al.* 2005b). Debido a la facultad de esta modificación de relajar las uniones entre histona y DNA y generar un estado abierto de la cromatina, la acetilación de K16H4 también se ha asociado a la reparación del DNA, ya que facilita la unión al DNA de las proteínas de reparación (GUPTA *et al.* 2005; YU *et al.* 2005). Además AcK16H4 puede ser reconocido y unirse a varios factores, por ejemplo, al factor de transcripción Bdf1, componente del complejo Swr1 de remodelaje de la cromatina (LADURNER *et al.* 2003). También se ha visto que esta modificación dificulta el acceso de otros factores al DNA, por ejemplo, la AcK16H4 elimina la unión de Sir3 en levadura, limitando así el silenciamiento génico que éste produciría (HECHT *et al.* 1995).

La acetilación de histonas es un proceso reversible y altamente dinámico mediado por dos clases de enzimas con actividades opuestas, las acetiltransferasas de histonas (HATs) y las desacetilasas de histonas (HDACs) (Figura 2).

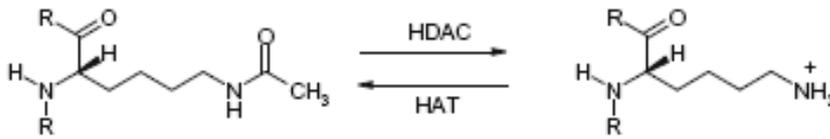


Figura 2: Reacción reversible de acetilación de histonas catalizada por HDACs y HATs

4.9.1. Acetiltransferasas de histonas (HATs)

Las HATs son las enzimas responsables de la adición de un grupo acetilo de la acetil-colina a ciertas lisinas del extremo amino terminal de las histonas. Las HATs se pueden clasificar siguiendo dos criterios, según su homología y según su función. En función de la homología de secuencia se clasifican en 3 familias: GNAT, CBP/P300 y MYST (SANTOS-ROSA and CALDAS 2005). Según su función, las HATs se pueden clasificar en dos tipos: las HATs de tipo A, responsables de la acetilación de histonas implicadas en la regulación de la estructura de la cromatina y de la transcripción génica (CARROZZA *et al.* 2003); y las HATs de tipo B, proteínas citoplasmáticas que catalizan la acetilación de histonas en el citoplasma (en particular de la lisina 5 y 12 de la histona H4) antes de que se unan a la nueva hebra de DNA recién replicado (PARTHUN *et al.* 1996; VERREAULT *et al.* 1998).

4.9.2. Desacetilasas de histonas (HDACs)

4.9.2.1 Tipos

Las HDACs humanas están divididas, basándose en su homología con las HDACs de levadura, en cuatro familias: Clase I, Clase II, Clase III o Sirtuinas y Clase IV. Las HDACs de clase I comprenden a la HDAC-1, -2, -3, y -8. Las HDACs de clase II están subdivididas, según homología en su secuencia y según su organización en dominios, en dos clases: IIa y IIb. Las HDACs de clase IIa incluyen a las enzimas HDAC-4, -5, -7 y -9 y las de clase IIb, la HDAC-6 y HDAC-10. Las HDACs de clase III son enzimas dependientes de NAD⁺ y conforman la familia de las Sirtuinas, llamada así por su homología con ySIR2 de levadura. La clase IV de HDACs está conformada únicamente por la

HDAC11 (Tabla 2). Las clases I, II y IV, también llamadas HDACs clásicas, comparten homología en sus secuencias y requieren Zn^{+2} para ejercer su actividad de desacetilación. En cambio, las Sirtuinas no comparten homología con las otras clases de HDACs y necesitan NAD^+ como cofactor.

FAMILIA	MIEMBRO	LOCALIZACIÓN CELULAR	LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA	SUSTRATOS NO HISTÓNICOS
Clase I	HDAC1	núcleo	1p34	p53, MyoD, E2F-1, Stat3, androgen
	HDAC2	núcleo	6q21	Bcl-6, Stat3, GR, YY-1
	HDAC3	núcleo	5q31	GATA-1, RelA, Stat3, MEF2D, YY-1, SHP
	HDAC8	Núcleo/citoplasma	Xq13	nd
Clase IIa	HDAC4	Núcleo/citoplasma	2q37	GCMa, GATA-1, HP-1
	HDAC5	Núcleo/citoplasma	17q21	Smad7, HP-1, GCMa
	HDAC7	Núcleo/citoplasma	12q13 (2 isoformas)	FLAG1, FLAG2
	HDAC9	Núcleo/citoplasma	7p15-p21 (3 isoformas)	nd
Clase IIb	HDAC6	citoplasma	Xp11	α -tubulina, HSP90, SHP, Smad7
	HDAC10	citoplasma	22q13	HSP90?
Clase IV	HDAC11	Núcleo/citoplasma	3p25	nd

Tabla 2: HDACs clásicas. GR: receptor de glucocorticoides. nd: no determinado. Tabla adaptada de Witt *et al.* (WITT *et al.* 2009)

Las HDACs de clase I se expresan en todas las células, con localización predominantemente nuclear y tienen un papel muy importante en la regulación de la proliferación. HDAC2 parece que puede suprimir la apoptosis en células tumorales (HUANG *et al.* 2005a). En cambio, HDAC6, que está localizada en el citoplasma, desacetila a α -tubulina e interviene en el control de la dinámica de microtúbulos (ZILBERMAN *et al.* 2009) y además, también se ha visto que tiene la facultad de unirse directamente a proteínas ubiquitinadas (BOYAULT *et al.* 2006).

Las HDACs de clase II tienen un papel más importante a nivel local, estando estrechamente ligadas a procesos de diferenciación celular. Se localizan tanto en núcleo como en citoplasma y su expresión es específica de tejido. HDAC9 está implicada en la diferenciación de cardiomiocitos (ZHANG *et al.* 2002), mientras que HDAC7 está implicada en la regulación negativa y en la apoptosis de las células T (DEQUIEDT *et al.* 2003).

4.9.2.2 Funciones

Las HDACs pueden **regular la expresión génica** de distintas formas. En primer lugar, las HDACs pueden impedir la transcripción génica mediante su actividad desacetiladora de histonas, que produciría un incremento entre las interacciones iónicas de las histonas cargadas positivamente y el DNA cargado negativamente, produciendo una estructura de la cromatina más compacta que dificultaría el acceso a los factores de transcripción y maquinaria de transcripción. Además, las HDACs pueden regular la expresión génica de otras formas. Pueden hacerlo por interacción directa con factores de transcripción (E2F, p53, Rb, NF-κB (LIN *et al.* 2006)...) o bien, ejerciendo su actividad catalítica sobre sustratos no histónicos implicados en funciones de homeostasis, diferenciación y apoptosis (MINUCCI and PELICCI 2006).

Las HDACs son enzimas clave en la **regulación del ciclo celular** y la apoptosis gracias a su interacción con determinados factores de transcripción. Por ejemplo, HDAC1 y HDAC2 están implicadas en la represión transcripcional mediada por la proteína Rb. E2F, factor de transcripción implicado en el control del ciclo celular, se asocia a la proteína Rb reprimiendo la transcripción de los genes que están bajo su control. Esta represión puede estar causada por un reclutamiento de HDACs a los promotores de estos genes (ROBERTSON *et al.* 2000).

Una de las interacciones mejor conocidas entre HDACs y proteínas no histónicas es la interacción de HDACs y DNA metilado mediante la unión a proteínas con un dominio de unión al DNA metilado (MBD, *methyl-binding domain*). Las proteínas MBD reclutan complejos que contienen HDACs a promotores hipermetilados como mecanismo de represión génica (JONES *et al.* 1998). Las HDACs también pueden interaccionar con otras proteínas modificadoras epigenéticas, tales como metiltransferasas del DNA. Por ejemplo, se ha observado que células tumorales deficientes en DNMT1 tienen incrementados los niveles de H3 acetilada y disminuidos los de H3 metilada. Estos cambios se asocian con una pérdida de interacción de HDACs y proteína HP1 (*heterochromatin protein 1*) con la histona H3 (ESPADA *et al.* 2004).

4.9.2.3 HDACs y cáncer

Las actividades relacionadas con HDACs pueden estar relacionadas con el desarrollo de un proceso tumoral de varias formas.

En primer lugar, se ha estudiado el patrón de expresión de los distintos tipos de HDACs en cáncer. HDAC1 está sobre-expresada en tumores gástricos (KIM *et al.* 2007b), de próstata (HALKIDOU *et al.* 2004), de mama (SUZUKI *et al.* 2009) de colon (ISHIHAMA *et al.* 2007), renal (FRITZSCHE *et al.* 2008), de próstata (WEICHERT *et al.* 2008) y de ovario (JIN *et al.* 2008). HDAC2 también tiene altos niveles de expresión en cáncer de ovario (JIN *et al.* 2008), renal (FRITZSCHE *et al.* 2008), mama (SUZUKI *et al.* 2009), próstata (WEICHERT *et al.* 2008) y colorrectal (ASHKTORAB *et al.* 2009), mientras que HDAC3 está sobre-expresada en cáncer renal (FRITZSCHE *et al.* 2008), de ovario (JIN *et al.* 2008) y próstata (WEICHERT *et al.* 2008) y HDAC6 en tumores de mama (SUZUKI *et al.* 2009). La sobre-expresión de las HDACs en distintos tipos tumorales se puede asociar a la formación de complejos represores en la región promotora de los genes supresores tumorales. Por ejemplo, se ha visto que $p21^{WAF1}$ está reprimido epigenéticamente por hipoacetilación de las histonas a nivel de promotor mediada por la actividad de HDAC1 (GUI *et al.* 2004). Otro ejemplo es la represión de la *E-CADERINA* por el reclutamiento aberrante de HDACs a su promotor, promoviendo así la invasión tumoral y la metástasis (Figura 3)(VON BURSTIN *et al.* 2009).

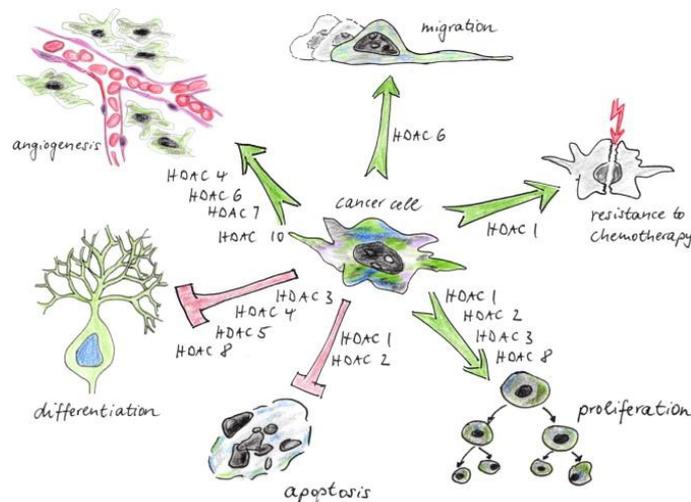


Figura 3: Implicación de HDACs clásicas en la biología del cáncer. Imagen de (WITT *et al.* 2009)

Además se ha observado una relación directa entre inactividad de HDAC y desarrollo del cáncer. Ropero *et al.* (ROPERO *et al.* 2006). describieron una mutación en el gen de HDAC2 en carcinomas colorrectales y observaron que esta falta de actividad enzimática estaba relacionada con un mayor desarrollo tumoral que podría estar producido por un incremento en la expresión de ciertos oncogenes.

El papel de las HDACs en cáncer no está restringido a su acción sobre las histonas, sino que también está implicada su acción catalítica sobre sustratos no histónicos. Por ejemplo, HDAC1 interacciona y desacetila a p53, desestabilizándolo e inactivándolo, provocando un escape de las células tumorales a la muerte por apoptosis (JUAN *et al.* 2000).

5. Sirtuinas

Las Sirtuinas son proteínas homólogas a la familia Sir2 de *S. cerevisiae*, implicada en el silenciamiento epigenético de telómeros, DNA ribosómico nucleolar y de genes implicados en el tipo de cruzamiento (Guarente 1999). Las Sirtuinas requieren como cofactor metabólico NAD^+ para ejercer su actividad enzimática. Su dominio catalítico, altamente conservado, puede ejercer dos tipos de reacciones enzimáticas: la desacetilación y la ADP-ribosilación. Durante la reacción de desacetilación, NAD^+ se hidroliza para generar nicotinamida, 2'-O-acetil-ADP-ribosa y la diana desacetilada. En cambio, durante la reacción de ADP-ribosilación, la ADP-ribosa se une a la proteína diana acetilada y se libera la nicotinamida (Figura 3).

Hay dos mecanismos de retroalimentación que regulan la actividad catalítica de las Sirtuinas. En primer lugar, la nicotinamida es un inhibidor de la enzima, ya que compite directamente con NAD^+ por la unión al dominio catalítico. En segundo lugar, los niveles de NAD^+ controlan la actividad de las Sirtuinas. Los niveles de NAD^+ y NADH están regulados por varias enzimas y están ligados a la dieta y al estado metabólico de la célula. La enzima nicotinamida fosforibosiltransferasa (*Nampt*) utiliza la nicotinamida para regenerar NAD^+ y así promover la actividad de las Sirtuinas (YANG *et al.* 2006).

En cambio, la poli-ADP-ribosa polimerasa (*PARP*), una proteína nuclear implicada en la reparación del DNA, cataliza la reacción contraria; utiliza NAD^+ para generar nicotinamida y ADP-ribosa (Figura 3).

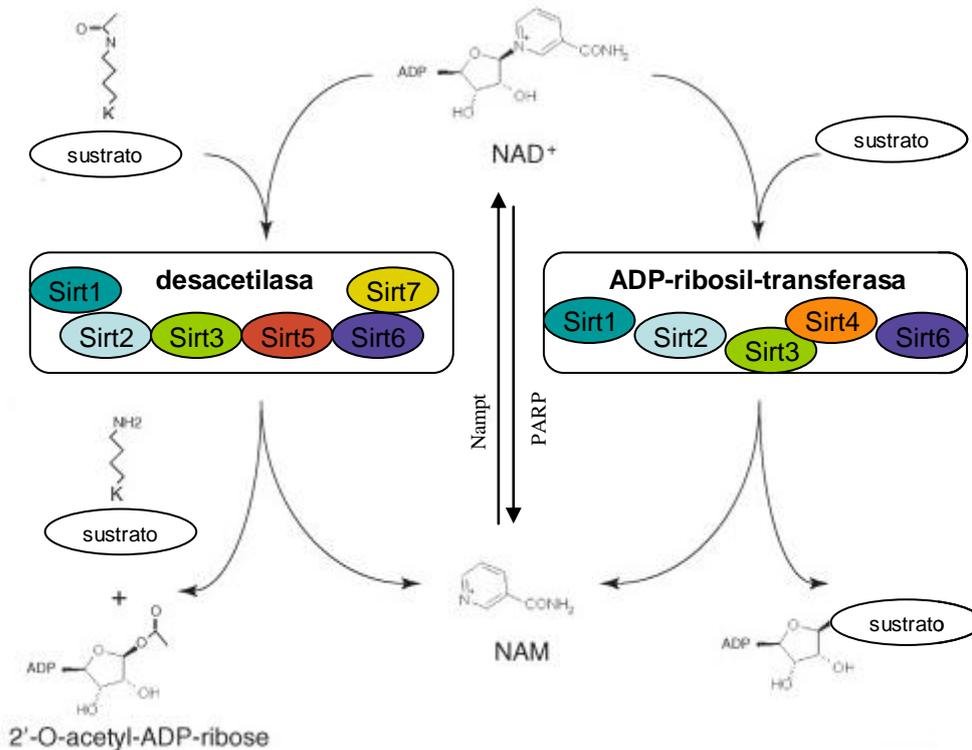


Figura 3: Actividades enzimáticas de las Sirtuinas. Las sirtuinas catalizan las reacciones de desacetilación y ADP-ribosilación. Ambas reacciones necesitan NAD^+ como cofactor y producen nicotinamida. Imagen tomada de Feige and Auwerx (Feige and Auwerx 2008) . NAM: nicotinamida

En mamíferos se han descrito siete proteínas pertenecientes a la familia de las Sirtuinas, Sirt1, -2, -3, -4, -5, -6 y-7. Sirt1, 6 y 7 se localizan en el núcleo, Sirt2 en el citoplasma y Sirt3, 4 y 5 en la mitocondria (Tabla 3).

Las Sirtuinas se caracterizan por tener una gran variedad de proteínas diana sobre las que ejercer su actividad enzimática, pueden actuar tanto sobre sustratos histónicos (K16H4...) como no histónicos (p53, FOXO...). Gracias a esta variabilidad de sustratos y localización celular, su actividad se ha relacionado con una gran variedad de procesos biológicos, senescencia, apoptosis, regulación del ciclo celular y reparación del DNA.

Tipo (localización cromosómica)	Localización celular	Sustratos	Funciones celulares
Sirt1 (10q21.3)	núcleo y citoplasma (predominantemente nuclear)	Histonas: K26H1, K9H3, K14H3, K16H4, H2A.Z No histonas: p53, FOXO, PGC-1 α , Ku70, NF- κ B, PPAR γ , p300, CBP, TAF1B, Pol I, HES1, HEY2, PML, MyoD, Tat, BCL-6, Rb, p73, PCAF, LXR, β -catenina, H1C1, TAF168	Regulación metabolismo celular, neuroprotección, papel antiinflamatorio, cardioprotección, estimulación de la transcripción del HIV, antioxidante, regulación de la autofagia, supervivencia celular, envejecimiento, anti- tumoral, pro-tumoral
Sirt2 (19q13.2)	núcleo y citoplasma (predominantemente citoplasmática)	Histonas: K14H3, K16H4 No histonas: α -tubulina, p53, FOXO	Regulación del ciclo celular, supresión tumoral (gliomas), mielinogénesis, diferenciación de adipocitos, inhibición de la adhesión celular y la migración
Sirt3 (11p15.5)	Mitocondria (membrana interna)	Histona: K16H4 No histonas: acetilCoA- sintetasas, GDH	Regulación del metabolismo celular, termogénesis, apoptosis, supervivencia celular, envejecimiento
Sirt4 (12q24.31)	Mitocondria	Glutamato deshidrogenasa	Regulación de secreción de insulina
Sirt5 (6p23)	Mitocondria	H4, citocromo C, p53	Regulación del metabolismo y del ciclo de la urea
Sirt6 (19p13.3)	Nuclear	Histona K9H3	Reparación del DNA, mantenimiento de telómeros, homeostasis de la glucosa
Sirt7 (17q25.3)	Nucleolar	p53	Activación de la RNA pol I, supervivencia celular, envejecimiento

Tabla 3: Resumen de los tipos de Sirtuinas en humanos y su función biológica asociada. Tabla modificada de (INOUE *et al.* 2007a).

5.1 Sirt1

Sirt1 es una proteína predominantemente nuclear de 747 aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 80KDa. Sirt1 cataliza la reacción de desacetilación sobre una gran variedad de sustratos, histonas y proteínas no histónicas.

Sirt1 tiene actividad de desacetilación sobre los siguientes residuos de **histonas:** K26H1, K9H3, K16H4, K14H3 y H2A.Z.

Las **proteínas no histónicas** sobre las que Sirt1 puede ejercer su actividad se pueden dividir en tres grandes grupos:

- factores de transcripción: proteínas de la familia FOXO, p53, PGC1- α , PPAR γ , MyoD, NF- κ B, E2F1, etc.
- proteínas de reparación del DNA: ku-70 y MRN.
- enzimas relacionadas con la cromatina: las HATs p300 y PCAF (factor asociado a P300/CBP), los correpresores NcoR/SMRT, etc.
- factores de señalización: Smad7 y eNOS.

La actividad de Sirt1 está relacionada con una gran variedad de procesos biológicos: homeostasis celular, diferenciación, senescencia, ciclo celular, además de sus funciones reguladores de la transcripción génica y formación de heterocromatina asociadas a su actividad catalítica sobre residuos histónicos.

Sirt1 participa activamente en los procesos de **diferenciación celular** del músculo esquelético y de adipocitos. Sirt1 se une a PCAF, inhibiendo al factor de transcripción MyoD responsable de la diferenciación a miocitos. Además, Sirt1 inhibe la diferenciación a adipocitos, impidiendo la unión de PPAR γ a sus cofactores NcoR y SMRT (FEIGE and AUWERX 2008; PICARD *et al.* 2004).

Sirt1 también se ha relacionado con la promoción de la **supervivencia celular**, ya que inicia el arresto del ciclo celular y promueve la reparación del DNA a través de la desacetilación de FOXO y Ku70. La desacetilación de FOXO suprime la activación de las proteínas proapoptóticas Bim y ligando de Fas y promueve la activación de p27^{kip} y GADD45a para inducir el arresto del ciclo celular (BRUNET *et al.* 2004; KOBAYASHI *et al.* 2005). Por otro lado, Sirt1 desacetila e inactiva a Ku70 (COHEN *et al.* 2004a; COHEN *et al.* 2004b), con lo cual no participa activamente en la reparación del daño producido en el DNA ni induce apoptosis al no poder activar a la proteína proapoptótica Bax (SAWADA *et al.* 2003). Además de a través de Ku70, SIRT1 está ligada a la reparación del daño en el DNA mediante su interacción con el complejo MRN, implicado en la reparación por recombinación homóloga (YUAN *et al.* 2007). Otra de las dianas de SIRT1 es NF- κ B, principal promotor de la tumorigénesis inducida por inflamación crónica. NF- κ B se mantiene de forma inactiva en el citoplasma celular y se trasloca al núcleo en respuesta al estrés, a la infección y a la inflamación, en donde induce la transcripción de genes implicados en la

regulación del ciclo celular, de apoptosis, de proliferación y de migración celular (PIVA *et al.* 2006). Por lo tanto, la desacetilación de NF- κ B por SIRT1 reprimiría la transcripción de los genes dependientes de NF- κ B, promoviendo así la supervivencia celular (YEUNG *et al.* 2004).

La actividad de Sirt1 también está asociada al **metabolismo de los carbohidratos**. Se ha observado que el aumento en la actividad de SIRT1 producida por la restricción calórica, aumenta los niveles de insulina en las células β pancreáticas, inhibe la glucólisis y estimula la gluconeogénesis en el hígado, debido a la desacetilación de PGC1- α (BANKS *et al.* 2008; ERION *et al.* 2009; HAIGIS and GUARENTE 2006).

Sirt1 puede intervenir en la **formación de la heterocromatina** facultativa a varios niveles:

- facilitando la compactación de la cromatina a través de la desacetilación de K16H4, K9H3 y K26H1 (VAQUERO *et al.* 2004)
- eliminando marcas relacionadas con un estado transcripcionalmente activo de la cromatina, como la 2meK79H3 (VAQUERO *et al.* 2004).
- promoviendo la incorporación de marcas asociadas a la heterocromatina, como la 3meK9H3 y 1meK20H4. SIRT1 promueve la trimetilación de la K9H3 mediante el reclutamiento y desacetilación de la histona metiltransferasa Suv39h1, principal enzima que metila este residuo (PETERS *et al.* 2001; SCHER *et al.* 2007). Además Sirt1 puede formar un complejo con Suv39h1 que se une a K9H3 en el locus de DNAr, lo que provoca la dimetilación y desacetilación de K9H3, reprime la transcripción de DNAr y establece un estado de heterocromatina en este locus, protegiendo a las células de la apoptosis (MURAYAMA *et al.* 2008).

5.1.1 Regulación de la expresión de Sirt1

La expresión de Sirt1 está regulada por distintos factores y a distintos niveles, a nivel transcripcional y a nivel post-transcripcional (Figura 4).

A nivel transcripcional

- a través de p53. El promotor de Sirt1 presenta dos sitios de unión a p53. La unión de p53 a estos sitios reprimiría la expresión de Sirt1. En ausencia de nutrientes, FOXO3 se traslocaría al núcleo, interaccionaría con p53, inhibiendo así su actividad represora sobre Sirt1. Además, como p53 y Foxo son dianas de acción de Sirt1, este mecanismo de regulación tendría un componente de retroalimentación negativa (NEMOTO *et al.* 2004).

- a través de E2F1. El regulador de la apoptosis y ciclo celular E2F1 se une al promotor de Sirt1 induciendo su expresión. A su vez, Sirt1 inhibe la expresión de E2F1 desacetilándolo, lo que a su vez, tiene efectos sobre la apoptosis y sobre la reparación del DNA. Así pues, la pérdida de E2F1 tendría un doble efecto: se deterioraría la respuesta de reparación del DNA dañado e incrementaría la expresión de Sirt1, lo cual afectaría a la apoptosis celular (WANG *et al.* 2006).

- a través de H1C1 (*gen supresor tumoral hipermetilado en cáncer*). Sirt1 desacetila a H1C1 y promueve su sumoilación. Cuando H1C1 esta desacetilado y sumoilado ejerce un efecto represor sobre la expresión de Sirt1 (CHEN *et al.* 2005).

A nivel post-transcripcional

- por el ratio $NAD^+/NADH$ celular y por los niveles de nicotinamida. Cuanto mayor sea el ratio y menor los niveles de nicotinamida, mayor será la expresión de Sirt1. La concentración celular de NAD^+ está relacionada con la restricción calórica. La restricción calórica provoca el aumento de la concentración celular de NAD^+ , y por lo tanto, aumenta la actividad de las Sirtuinas, y en particular de SIRT1 (COHEN *et al.* 2004b). En cambio una alta concentración de nicotinamida produce una disminución de la expresión de Sirt1.

- a través de HuR. HuR es una proteína que se une al extremo 3'UTR de RNAm de Sirt1 y lo estabiliza. A su vez, HuR está regulado por fosforilación, reacción catalizada por Chk2. Cuando HuR está fosforilada se disocia del

RNA_m de Sirt1, con lo cual desciende la estabilidad del transcrito y bajan los niveles de la proteína de Sirt1. La actividad de Chk2 aumenta por estrés oxidativo y daño en el DNA, teniendo como consecuencia final el descenso de expresión de Sirt1 y aumentando la sensibilidad de la célula a la inducción de apoptosis a través de la acetilación de p53 y otros factores (ABDELMOHSEN *et al.* 2007).

- a través de AROS (*active regulator of Sirt1*), un regulador positivo endógeno se Sirt1. AROS aumenta la actividad desacetilasa de Sirt1 (KIM *et al.* 2007a).

- a través de DBC1. DBC1 (*supresor tumoral deleccionado en cáncer de mama 1*) actúa como un inhibidor de Sirt1, ya que se une al centro catalítico de la enzima inhibiendo su acción (ZHAO *et al.* 2008).

- a través de SENP1 (*SUMO-specific protease 1*). SENP1 es una desumoilasa proapoptótica nuclear que reduce la acción desacetilasa de Sirt1. Bajo condiciones de estrés celular, SENP1 se une directamente al extremo carboxilo de la proteína Sirt1 y la inactiva por desumoilación, produciendo una activación de la apoptosis celular mediada por p53 (YANG *et al.* 2007).

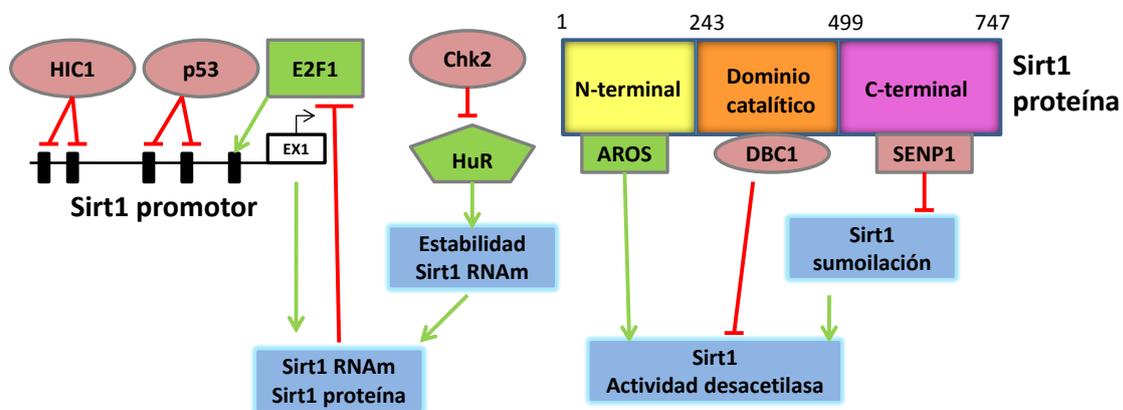


Figura 4: Regulación de la expresión de Sirt1 a nivel transcripcional y posttranscripcional. Imagen modificada de (LIU *et al.* 2009).

5.2 Sirt2

Sirt2 es una enzima principalmente citoplasmática que participa en la regulación del ciclo celular a través de la dinámica de ensamblaje de microtúbulos y de su implicación en la compactación de la cromatina. Las dos

dianas principales de la actividad enzimática de Sirt2 son AcK16H4 y α -tubulina.

Sirt2 participa en el bloqueo del ciclo celular a nivel de G2/M bajo condiciones de estrés mitótico o crecimiento incontrolado previniendo la condensación de los cromosomas a través de la desacetilación global de K16H4 (INOUE *et al.* 2007b; INOUE *et al.* 2009). Sirt2 se asocia a la HDAC6 y desacetila a la α -tubulina, participando así con la organización y ensamblaje de microtúbulos (INOUE *et al.* 2009; NORTH *et al.* 2003).

Sirt2 también puede estar localizada en el núcleo. Durante la transición de G2/M, Sirt2 es hiperfosforilada y transportada al núcleo, lo que coincide con una desacetilación masiva de K16H4 antes de la mitosis que asegura una correcta condensación de la cromatina en los cromosomas (VAQUERO *et al.* 2006). De todas formas, aún no se sabe bien si los efectos de Sirt2 sobre el punto de control G2/M se debe a su acción sobre la K16H4 o bien, a otros sustratos desconocidos. Estudios recientes han implicado a Sirt2 como posible responsable del silenciamiento génico de distintos factores tales como FOXO o P300 (BLACK *et al.* 2008; WANG and TONG 2009), lo cual la sitúa directamente en el núcleo celular.

Además de estas funciones sobre la cromatina y el ciclo celular, se han descrito funciones para Sirt2 específicas de tejido. Por ejemplo, en el cerebro, parece que está asociada a la diferenciación oligodendrocítica, y se relaciona con enfermedades neurodegenerativas (OUTEIRO *et al.* 2007).

5.3 Sirt3, Sirt4 Y Sirt5

Estas tres Sirtuinas están localizadas en la mitocondria, por lo que parecen estar estrechamente ligadas a la regulación del metabolismo celular.

Sirt3 está asociada a la regulación del metabolismo mitocondrial, a la termogénesis adaptativa, a la regulación de la energía y a la apoptosis a través de la desacetilación de numerosas proteínas mitocondriales, tales como la acetil-CoA sintetasa (SCHWER *et al.* 2006; SCHWER *et al.* 2002), FOXO (JACOBS *et al.* 2008) o PGC-1 α . Sirt3 es la única de las Sirtuinas mitocondriales que está ligada a la regulación de la cromatina. Se puede localizar en el núcleo, en

donde induce represión génica por desacetilación de histonas, principalmente de K16H4 (SCHER *et al.* 2007).

Sirt4 está implicada en la inhibición de la secreción de insulina (AHUJA *et al.* 2007; ARGMANN and AUWERX 2006) a través de la represión que ejerce sobre la enzima GDH, proteína mitocondrial que convierte el glutamato en α -ketoglutarato (HAIGIS *et al.* 2006).

Sirt5 parece estar ligada funcionalmente a la Sirt3 (NAKAMURA *et al.* 2008). Está relacionada con el control del ciclo de la urea mediante la activación ejercida sobre la enzima CPS1 (*carbamoil fosfato sintetasa 1*), que aumenta el catabolismo de aminoácidos (NAKAGAWA *et al.* 2009). Además, Sirt5 también puede desacetilar al Citocromo c, una proteína fundamental en el metabolismo oxidativo y en la iniciación de la apoptosis (SCHLICKEK *et al.* 2008).

5.4 Sirt6

Sirt6 es una enzima principalmente nuclear asociada a la cromatina que se expresa en la mayoría de los tejidos. Está implicada en funciones tales como la reparación del DNA, la integridad telomérica o la señalización de NF- κ B. Su función en la reparación del DNA estaría mediada a través de la ruta BER, responsable de la reparación de DNA dañado por estrés oxidativo o genotóxico (MOSTOSLAVSKY *et al.* 2006). La desacetilación de K9H3 mediada por Sirt6 está íntimamente ligada al mantenimiento de la integridad telomérica en mamíferos (MICHISHITA *et al.* 2008). La desacetilación de K9H3 por parte de Sirt6 también ocurre a nivel del promotor de NF- κ B, reprimiendo su expresión y, por lo tanto, incrementando la senescencia celular y produciendo una cierta resistencia a fenómenos apoptóticos (KAWAHARA *et al.* 2009).

5.5 Sirt7

Sirt7, localizada en el nucleolo celular, es un regulador positivo de la expresión de genes de DNA ribosómico gracias a su asociación a la RNA Pol I (FORD *et al.* 2006; GROB *et al.* 2009).

5.6 Sirtuinas y cáncer

Sirt1 y cáncer

Existe una controversia en cuanto a la función de Sirt1 como oncosupresor u oncogénico. Esta controversia se sustenta en los estudios de expresión de Sirt1 en tumores, en la actividad que ejerce sobre oncogenes y oncosupresores y en el amplio abanico de funciones donde se ha relacionado su actividad enzimática, que van desde la regulación del ciclo celular y la apoptosis hasta la regulación de la esperanza de vida descrita en varios modelos animales.

Sirt1 está sobre-expresado en una gran cantidad de tipos tumorales entre los que se incluyen próstata (HOFFMANN *et al.* 2007), colon (NOSHO *et al.* 2009), leucemia (BRADBURY *et al.* 2005), linfoma (JANG *et al.* 2008) y gástrico (KAWAHARA *et al.* 2009). La sobreexpresión de Sirt1 podría ser la causa de uno de los fenómenos comunes a muchos tipos tumorales, la hipoacetilación de K16H4 (FRAGA *et al.* 2005b; PRUITT *et al.* 2006). Además, el incremento en la expresión de Sirt1 produce la desacetilación e inactivación de p53, con lo cual las células tumorales adquirirían una ventaja selectiva de escape al proceso de apoptosis (CHEN *et al.* 2005).

En las células tumorales, Sirt1 se localiza en el promotor de los genes supresores tumorales densamente hipermetilados (*E-CADERINA*, *MLH1*, *GATA-4*, *GATA-5* y *p27*) contribuyendo así al estado de inactividad transcripcional. Sirt1 bloquea los procesos de senescencia, diferenciación celular y apoptosis y promueve el crecimiento celular, la angiogénesis y la vasodilatación (POTENTE *et al.* 2007).

Sin embargo, algunos estudios relacionan Sirt1 con una función de supresión tumoral. Por ejemplo, la sobreexpresión de Sirt1 en ratones APC^{min/+} reduce, en lugar de incrementar, la formación de tumores de colon. Esto se debe a que Sirt1 desacetila a β -Catenina y promueve su localización citoplasmática, en vez de su localización nuclear, relacionada con su actividad oncogénica (FIRESTEIN *et al.* 2008). Además, el resveratrol, que es un activador de Sirt1, induce apoptosis en estas células e inhibe la formación de tumores

(WANG *et al.* 2008). La sobreexpresión de Sirt1 inhibe el crecimiento y la proliferación *in vitro* de células de cáncer de próstata que expresan el receptor de andrógenos (FU *et al.* 2006).

Sirt2 y cáncer

La relación de la actividad enzimática de Sirt2 y el desarrollo del proceso tumoral aún necesita ser elucidada. Se ha descrito que Sirt2 está muy poco expresada en gliomas y que una sobreexpresión de Sirt2 reduce el número de clones estables en células de glioma en cultivo, sugiriendo que Sirt2 podría actuar como un gen supresor tumoral (HIRATSUKA *et al.* 2003). De todas formas su conexión con el cáncer es ineludible teniendo en cuenta el papel clave que Sirt2 ejerce sobre el control del ciclo celular, bloqueando la condensación cromosómica en respuesta a un estrés mitótico y previniendo la inestabilidad cromosómica (INOUE *et al.* 2007b). Así pues, la baja expresión de Sirt2 en gliomas podría conducir a una inestabilidad cromosómica y como consecuencia al desarrollo de un proceso tumoral.

Otras Sirtuinas y cáncer

Se han descrito distintos patrones de expresión del resto de las Sirtuinas en distintos tipos tumorales. Sirt7 está sobreexpresado en células tumorales tiroideas, mientras que tanto Sirt3 como Sirt7 tienen aumentada su expresión en tumores de mama (ASHRAF *et al.* 2006). Sirt3 se ha relacionado con vías apoptóticas basales y Sirt7 con la proliferación celular. Por el contrario, Sirt4 está poco expresado en células de leucemia mieloide (BRADBURY *et al.* 2005). En cuanto a la implicación de Sirt6 en cáncer se ha visto que es capaz de interactuar con *GCIP*, un posible gen supresor tumoral (MA *et al.* 2007).

6. Inhibidores de HDACs clásicas (HDACi)

Las HDACs regulan gran cantidad de procesos celulares como la expresión génica, la homeostasis, el control del ciclo celular, la diferenciación o la apoptosis celular. En tumores se han descrito patrones de expresión alterados de las distintas HDACs que ponen de manifiesto su implicación en los procesos de formación y progresión tumoral. Por todo ello, desde hace tiempo se viene considerando las HDACs como atractivas dianas para el desarrollo de terapias y drogas antitumorales.

Según su estructura química, los inhibidores de HDACs (HDACi) se pueden dividir en cuatro clases: ácidos grasos de cadena corta, ácidos hidroxámicos, péptidos cíclicos y benzamidas.

Ácidos grasos de cadena corta

Los más estudiados son los butiratos y el valproato. Su mecanismo de acción aún no está claro; podrían competir con el acetato liberado en la reacción de desacetilación. Los butiratos se han asociado a la inhibición del crecimiento tumoral en próstata, colon, endometrio, neuroblastoma... en donde actúan a concentraciones del rango de milimolar (CARDUCCI *et al.* 1996; CHEN *et al.* 2002; CONDORELLI *et al.* 2008).

El **butirato sódico (NaB)** es un producto de la fermentación anaeróbica generado por las bacterias intestinales y es uno de los ácidos grasos con actividad de HDACi mejor estudiados. Inhibe el crecimiento de células tumorales induciendo arresto del ciclo celular, diferenciación y apoptosis (KIM *et al.* 2007b; LI *et al.* 2008; MEDINA *et al.* 1998). Además, el NaB tiene un papel antiinflamatorio en la mucosa, gracias a la modulación que ejerce sobre ciertas citoquinas proinflamatorias (SAEMANN *et al.* 2000).

El **valproato sódico (VPA)** inhibe a las HDACs de clase I y IIa más eficientemente que el NaB. Aunque el VPA se usa como anticonvulsivo para el tratamiento de la epilepsia, numerosos estudios demuestran su efecto antitumoral en cáncer de próstata, neuroblastoma, etc. Reduce de forma significativa el crecimiento tumoral y la formación de metástasis en animales

con tumores. También es causante del arresto del ciclo celular (CINATL *et al.* 1997), de la descondensación de la cromatina (MARCHION *et al.* 2005) y de fenómenos de diferenciación celular (CINATL *et al.* 2002). Induce diferenciación en líneas celulares derivadas de neuroblastoma (BLAHETA *et al.* 2002; CINATL *et al.* 1996), glioma, teratocarcinoma y leucemias (GURVICH *et al.* 2004).

Ácidos hidroxámicos

A este grupo pertenecen dos de los HDACi más comúnmente utilizados en el laboratorio, la tricostatina A (TSA) y el ácido hidroxámico del suberoylanilide (SAHA).

El **TSA** fue aislado de *Streptomyces hygroscopicus* como antibiótico antifúngico y más tarde se demostró que poseía cualidades de agente antiproliferativo y diferenciador a muy bajas concentraciones en leucemia murina (YOSHIDA *et al.* 1987). El TSA es un inhibidor no competitivo de HDACs de clase I y de clase II, pero no ejerce ningún efecto sobre las Sirtuinas (KHAN *et al.* 2008). En las células tumorales de cáncer de pulmón y de melanoma, el TSA provoca la acetilación de histonas y la expresión de p21, independientemente de p53, que induce un retraso del ciclo celular en la fase G2/M y en una acumulación de Rb (ZHANG *et al.* 2009a). Además, el TSA parece estar ligado a una inhibición de la actividad de la telomerasa (MUKHOPADHYAY *et al.* 2005). Sin embargo, aunque se ha demostrado ampliamente la actividad antitumoral del TSA, aun no se ha utilizado en ensayos clínicos debido a la gran cantidad de efectos colaterales asociados a su uso.

El **SAHA** es un potente inhibidor de HDACs de clase I y II capaz de unirse y bloquear el centro activo de estas enzimas. Es muy eficaz como inductor de apoptosis y diferenciación celular a bajas concentraciones. Provoca arresto del ciclo celular y muerte en gran variedad de tipos tumorales *in vitro* e *in vivo* a concentraciones no tóxicas para las células normales (BUTLER *et al.* 2000; KELLY and MARKS 2005). El mecanismo por el cual ejerce esta acción antitumoral no está bien caracterizado, pero puede deberse en parte a la acumulación de histonas acetiladas que tiene como consecuencia una

activación transcripcional de muchos genes proapoptóticos, entre los que se incluyen p21^{WAF}, un inhibidor de la proliferación celular (Kelly and Marks 2005). Desde el año 2006, el SAHA, o también llamado Vorinostat, está aprobado por la US FDA (*Food and Drug Administration of United States*) como agente antitumoral para el tratamiento de CTCL (*Advanced Primary Cutaneous T-Cell Lymphoma*) y está siendo usado en numerosos ensayos clínicos contra el cáncer de próstata, melanoma, linfomas, etc.(<http://clinicaltrials.gov>). Se ha descrito un papel sinérgico del SAHA con otros tratamientos habituales contra el cáncer, como la radiación, inhibidores del proteosoma o agentes antiangiogénicos (BASCHNAGEL *et al.* 2009; HEIDER *et al.* 2009). Otro de los hidroxamatos con gran importancia clínica es el Panobinostat o LBH-589, que está en fase II y III para el tratamiento de leucemia mieloide crónica y mieloma múltiple.

Péptidos cíclicos

El HDACi más conocido y utilizado es el **Romidepsin o FK-228**. El Romidepsin es una pro-droga, ya que hasta que no llega a las células no se convierte en un compuesto activo, capaz de interaccionar con el zinc en el centro activo de las HDACs de clase I e inhibir su acción. Induce arresto del ciclo celular y apoptosis en una gran variedad de células tumorales. Produce apoptosis a través de la inhibición de la expresión de muchas vías de acción relacionadas con EGFR, resultando en una baja expresión de Bcl-2 y Bcl-xL, una sobreexpresión de Bax y activación de la cascada p38MAPK en células de cáncer pulmonar (YU *et al.* 2007). El Romidepsin está actualmente en estudio clínico para distintos tipos tumorales, en donde se están obteniendo respuestas favorables (MOLIFE *et al.* 2009; WOO *et al.* 2009).

Benzamidas

A este grupo pertenecen dos inhibidores que se están usando en ensayos clínicos

El **MS-275** inhibe de forma preferencial a HDAC1 y 9, mientras que es inactiva frente a HDAC4, -6, -7 y -8 (KHAN *et al.* 2008). Induce apoptosis de células tumorales de próstata, colon y de leucemia mieloide, linfocítica B-crónica y de células T (BRACKER *et al.* 2009; QIAN *et al.* 2007; VIRE *et al.* 2009). Actualmente, está siendo evaluada en clínica en administración conjunta con otros agentes antitumorales (<http://clinicaltrials.gov>).

El **MGCD-0103** es una benzamida que actúa específicamente sobre HDAC de clase I y IV. Induce hiperacetilación de histonas, apoptosis y bloqueo del ciclo celular en varias líneas tumorales humanas (FOURNEL *et al.* 2008). Actualmente está siendo utilizado en ensayos clínicos en pacientes con linfomas, leucemia o síndromes mielodisplásicos.

7. Inhibidores de Sirtuinas

Los inhibidores de Sirtuinas están menos validados como agentes antitumorales y, por lo tanto, menos desarrollados farmacológicamente que los inhibidores de las HDACs clásicas. Se debe fundamentalmente a la gran cantidad de dianas que presentan las Sirtuinas, que les hace estar involucradas en un alto número de procesos celulares, tales como, regulación del ciclo celular, apoptosis, activación o represión transcripcional y metabolismo. Además de la nicotinamida, que es un inhibidor endógeno de las Sirtuinas, se han descrito varios compuestos con actividad inhibidora de estas enzimas.

Splitomicin

Este compuesto, identificado por Bedalov *et al.* (BEDALOV *et al.* 2001), tiene una actividad inhibidora de Sir2 en *Saccharomyces cerevisiae*, pero debido a que no es muy eficaz contra las Sirtuinas humanas, se han desarrollado una serie de compuestos análogos una mayor actividad. Estos compuestos podrían ser útiles en el tratamiento contra el cáncer y en otras enfermedades, promoviendo la apoptosis de células cancerosas e inhibiendo transcripcionalmente la actividad de oncogenes. Por ejemplo, un análogo de Splitomicin, denominado HR73, inhibe la actividad de Sirt1 y de Tat, una proteína esencial para la activación transcripcional del provirus del virus de la

inmunodeficiencia humana (VIH). Estos resultados proponen a Sirt1 como candidata a diana terapéutica de pacientes con VIH (PAGANS *et al.* 2005).

Sirtinol

Grozinger *et al.* (GROZINGER *et al.* 2001) describieron un nuevo tipo de inhibidores de Sirtuinas, en los que la presencia del grupo 2-hidroxil-1-naftol era suficiente para ejercer su actividad. A este grupo pertenece el Sirtinol, que inhibe la actividad de Sirt1 y Sirt2 *in vitro*. Además, se han desarrollado compuestos análogos al Sirtinol que presentan una mayor actividad inhibidora contra Sirt1 y Sirt2 (MAI *et al.* 2005). El Sirtinol produce arresto del ciclo celular en líneas celulares de cáncer de mama y de pulmón (OTA *et al.* 2006). Aumenta la sensibilidad a camptothecin y cisplatino, dos drogas antitumorales, en PC3 (línea de cáncer de próstata) inhibiendo el crecimiento celular (KOJIMA *et al.* 2008). Además, el Sirtinol presenta actividad antiparasitaria induciendo apoptosis en amastigotes de *Leishmania infantum* (VERGNES *et al.* 2005).

AGK2

Este compuesto es un potente inhibidor de Sirt2. Outeiro *et al.* (OUTEIRO *et al.* 2007) lo usaron en un modelo de enfermedad de Parkinson y observaron que la inhibición de Sirt2 mediante AGK2 disminuía los efectos negativos causados por la proteína α -sinucleína asociados a esta enfermedad.

EX-527

Descrito por Napper *et al.* (NAPPER *et al.* 2005) como inhibidor específico de Sirt1, inhibe la desacetilación de p53 a bajas concentraciones, pero sin afectar a la proliferación celular (SOLOMON *et al.* 2006).

Cambinol

El Cambinol inhibe *in vitro* a Sirt1 y Sirt2. Presenta una actividad apoptótica muy potente en líneas celulares del linfoma de Burkitt por un mecanismo que implica la acetilación de BCL-6 y de p53 (HELTWEG *et al.* 2006).

Tenovinas

Estos compuestos fueron descritos inicialmente por Lain *et al.* (LAIN *et al.* 2008) como inhibidores de Sirt1, capaces de activar p53 y de inhibir el crecimiento tumoral a bajas concentraciones.

Suramina

En el 2007 se describió que Suramina, usado originariamente para el tratamiento de tripanosomiasis, inhibía a distintas Sirtuinas, Sirt1, Sirt2 y Sirt5 (SCHUETZ *et al.* 2007; TRAPP *et al.* 2007). Presenta un efecto antitumoral e inhibidor de la transcriptasa inversa, pero debido a su alta neurotoxicidad y a múltiples efectos colaterales no se usa para tratamiento terapéutico.

Otros inhibidores de Sirtuinas

Recientemente se han descrito otros inhibidores de Sirtuinas que necesitan un estudio más profundo. Por ejemplo, AC-93253 inhibe a Sirt2 produciendo hiperacetilación de las dianas de acción principales de esta enzima, α -tubulina y H4 y provocando citotoxicidad en células tumorales sin afectar a las células normales (ZHANG *et al.* 2009b). Además se han descrito otros compuestos con actividad inhibidora *in vitro* de Sirt2, como derivados de *N*-(3-(4-hydroxyfenil)-propenoyl)-amino acid tryptamides (KIVIRANTA *et al.* 2007), que necesitan un amplio estudio sobre los mecanismos de acción implicados y su efecto sobre las células tumorales.

OBJETIVOS

Las Sirtuinas son enzimas diana candidatas para el desarrollo de compuestos antitumorales. Las dos Sirtuinas directamente implicadas en la regulación del ciclo celular y apoptosis son Sirt1 y Sirt2. Sirt1 está estrechamente ligada al proceso de muerte celular por apoptosis mediado por la acción de p53 (van Leeuwen and Lain 2009) y además está relacionada con ciertas moléculas de adhesión celular, tales como E-caderina (O'HAGAN *et al.* 2008) y Cortactina (ZHANG *et al.* 2009c) muy importantes en los mecanismos de migración e invasión celular que caracterizan a un proceso metastásico. Sirt2 tiene un papel clave en la regulación del ciclo celular controlando el paso de fase G2 a M (DRYDEN *et al.* 2003; INOUE *et al.* 2007b) y la acetilación de K16H4 (VAQUERO *et al.* 2006), a la vez que está directamente implicada en la división celular debido a que una de sus principales dianas de acción es α -tubulina imprescindible para el ensamblaje de microtúbulos y la formación del huso mitótico (INOUE *et al.* 2007b).

En la actualidad varios grupos de investigación tienen como objetivo el desarrollo de nuevos compuestos capaces de modular la actividad enzimática de las Sirtuinas para producir un efecto anticancerígeno. Sin embargo, estos nuevos compuestos han de reunir una serie de características que no siempre cumplen. El compuesto ideal debe de inhibir específicamente la actividad enzimática de las Sirtuinas produciendo un efecto inhibitor de la proliferación celular o induciendo fenómenos de muerte celular y/o diferenciación celular específicamente en células tumorales, sin que se vea afectada de ninguna forma la integridad y funcionalidad de las células no tumorales. Otras propiedades deseables de inhibidores de Sirtuinas como posibles agentes antitumorales son que ejerzan su actividad máxima a concentraciones mínimas, que sean tolerables y que no sean tóxicas para el organismo.

Por tanto, el propósito principal de la presente Tesis Doctoral ha sido el desarrollo y la evaluación de inhibidores de Sirtuinas como posibles drogas antitumorales.

Los objetivos concretos de este trabajo fueron:

1. Diseño y síntesis de nuevas moléculas con posible capacidad de inhibición de Sirtuinas
2. Evaluación de la capacidad de inhibición *in vitro* de la actividad enzimática de Sirt1 y Sirt2 de los compuestos desarrollados en el objetivo 1.
3. Determinación de los efectos de estos compuestos sobre apoptosis, diferenciación y proliferación celular en líneas tumorales.
4. Caracterización detallada de los mecanismos moleculares de acción de los compuestos desarrollados en el objetivo 1 que hayan mostrado efectos antitumorales.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material

1.1 Inhibidores de Sirtuinas

En una primera fase del trabajo, en colaboración con el Dr. Antonello Mai, se diseñaron 10 compuestos (Tabla 1) que, en base al centro activo de las Sirtuinas y a la estructura molecular de otros inhibidores de Sirtuinas, pudiesen inhibir más eficientemente la actividad de las Sirtuinas.

El estudio del modelado tridimensional de los distintos compuestos inhibidores de Sirtuinas se ha llevado a cabo gracias al programa GOLD basado en un algoritmo genético (JONES *et al.* 1997). En primer lugar se definió el área de la estructura de la Sirtuina que se iba a considerar para el estudio de acoplamiento entre la enzima y el inhibidor. Se utilizó un región esférica de 10 Å alrededor del oxígeno O de la glicina167 (Gln 167). Además se estudió en profundidad el dominio de unión de la Sirtuina, los dominios de unión de la ribosa y del NAD⁺ y el dominio de unión del EX527, que es un inhibidor específico de Sirt1 (HUHTINIEMI *et al.* 2006). Cada uno de los ligandos (inhibidores a estudio) se acopló al área de la Sirtuina definida previamente unas 50 veces, cada vez con una orientación distinta, sin limitaciones ni sesgos. Para cada orientación del ligando y para cada área de la zona de unión, el programa dio una puntuación de acoplamiento entre ambas partes que fue decisiva para la elección de los compuestos que mejor se acoplaban a la Sirtuina.

Todos los compuestos se disolvieron en DMSO (dimetilsulfóxido), se hicieron alícuotas a una concentración de 100 mM y se conservaron a -20° hasta su uso.

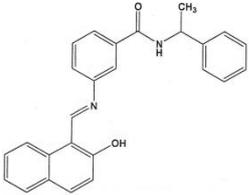
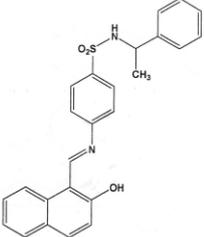
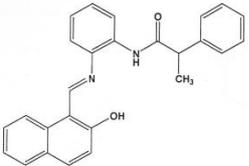
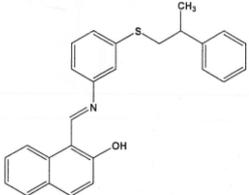
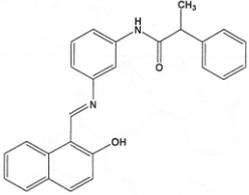
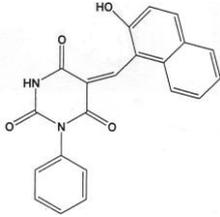
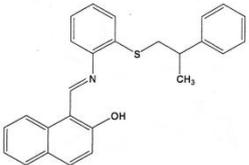
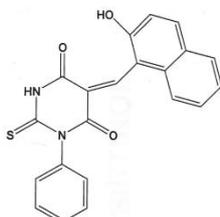
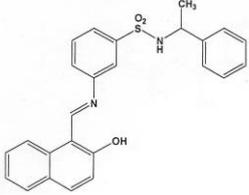
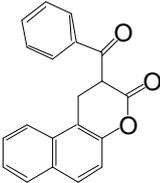
NOMBRE	ESTRUCTURA	NOMBRE	ESTRUCTURA
MC1591		MC1801	
MC1775		MC1808	
MC1776		MC2139	
MC1793		MC2140	
MC1800		MC2193	

Tabla 1: Nuevos compuestos sintetizados inhibidores de Sirtuinas

1.2 Líneas celulares

Las líneas celulares tumorales y la línea no tumoral humanas utilizadas en el estudio procedían de la ATCC (American Type Culture Collection) (Tabla 2).

NOMBRE	ORIGEN, TIPO
MOLT4	leucemia linfoblástica aguda, linfocitos T
JURKAT	leucemia aguda de linfocitos T, linfocitos T
REH	leucemia linfocítica aguda, linfoblastos
K562	leucemia mieloide crónica, linfoblastos
KG1A	leucemia mieloide aguda, mieloblasto
MV4-11	leucemia mielomonocítica, linfoblastos
HL60	leucemia promielocítica aguda, promieloblasto
U937	linfoma histiocítico, monocitos
RAJI	linfoma de Burkitt's, linfocitos B
HUT78	linfoma, linfocitos T
SW480	adenocarcinoma colorrectal, epitelial
RKO	carcinoma de colon, epitelial
MDA-MB-231	adenocarcinoma de mama, epitelial
MRC5	pulmón no tumoral, fibroblastos

Tabla 2: Líneas celulares utilizadas en el estudio y procedentes de la ATCC

2. Métodos

2.1 Inhibición *in vitro* de Sirt1 y Sirt2

La capacidad de inhibición *in vitro* de los nuevos compuestos sintetizados se determinó midiendo las actividades enzimáticas de Sirt1 y Sirt2 mediante un ensayo de fluorescencia para evaluar la actividad histona desacetilasa (*Fluor de Lys* HDAC Fluorimetric Assay, AK-500, BIOMOL Research Laboratories). En este método la muestra se incubó con el sustrato *Fluor de Lys* (Fluorimetric Histone deacetylase Lysyl) y la desacetilación del sustrato se cuantificó mediante un revelador que genera un fluoróforo. La fluorescencia se midió con un lector fluorométrico (Wallac VICTOR III fluorescence plate reader, Perkin-Elmer) usando una longitud de onda de excitación de 360 nm y una de detección de 450 nm. Para las reacciones, que se llevaron a cabo a una temperatura de 37 °C, se utilizaron 1 µg de Sirt1 y Sirt2, 250 µM de sustrato de histona acetilada, 200 µM de NAD⁺, 1 mM de

ditiotreitól y el inhibidor a estudio a diferentes concentraciones, 0, 20, 75, 100, 150 y 300 μM . Los resultados se expresaron como la media y la desviación estándar de cuatro experimentos independientes.

2.2 Cultivo y tratamientos con inhibidores de sirtuinas de las líneas celulares

Las líneas tumorales adherentes (SW480, MDA-MB-231) y MRC5 se cultivaron a una temperatura de 37°C y un nivel de CO_2 del 5% en medio DMEN (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con un 10% de FBS (suero fetal bovino) y con penicilina, estreptomina y fungizona. Las líneas tumorales que crecen en suspensión (MOLT4, KG1A, K562 y RAJI) se mantuvieron bajo las mismas condiciones de cultivo, pero empleando para ello como medio de cultivo, RPMI-1640.

Los inhibidores de Sirtuinas se añadieron al medio de cultivo cuando las células estaban en su fase exponencial de crecimiento, a distintas concentraciones finales, en un rango de $0\mu\text{M}$ (sólo con el medio de disolución, DMSO) a $100\mu\text{M}$, y durante intervalos de tiempo de 24 a 72 horas.

2.3 Reactivación de la expresión génica mediante tratamiento con 5-aza-2'-desoxicitidina (AZA) y Tricostatina A (TSA)

Las líneas celulares se trataron con una dosis de AZA (Sigma) de $2\mu\text{M}$ durante 72 h y con recambio de medio y de inhibidor cada 24 h. Este agente desmetilante revierte el estado de represión transcripcional de los genes metilados. Durante las últimas 24 h de tratamiento con AZA se añadió TSA (Sigma) al medio de cultivo a una concentración de 300 nM. El TSA revierte el estado de represión transcripcional mediado por desacetilación de histonas.

2.4 Ensayo de viabilidad celular

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) realizada por la

enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Es un método muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Las líneas celulares se sembraron en placas de 96 pocillos con fondo en U (para las líneas en suspensión) o con fondo plano (para líneas adherentes) a una concentración final de $1,5 \times 10^5$ células/ml o de 30×10^5 células/ml, dependiendo del tipo celular. El medio de cultivo contenía el inhibidor en estudio a la concentración deseada y éste se dejó actuar durante 24 h, 48 h, y 72 h. Después del tiempo señalado de tratamiento se añadió 50µg de MTT por pocillo y se dejó incubar durante 3 horas a 37°C en una atmósfera del 5% de CO₂. Después de 3 horas de incubación se eliminó el MTT y los cristales formados de formazán se disolvieron en DMSO para formar una solución color violeta en la que se pudiera cuantificar la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro. La densidad óptica es proporcional a la cantidad de formazán formado y por lo tanto, al número de células vivas presentes en el medio. Cada uno de los puntos obtenidos (porcentaje de células vivas con respecto al control) se expresa como la media y desviación estándar de los datos de densidad óptica de 50 medidas distintas. El cálculo de la concentración máxima inhibidora (IC50) se determinó mediante MTT y los resultados se expresan como la media y desviación estándar de 3 ensayos distintos de viabilidad celular.

2.5 Estudio de apoptosis y ciclo celular por citometría de flujo

Para determinar el porcentaje de células apoptóticas del cultivo celular, las células se incubaron con Anexina V-FITC (BD Pharmingen) y yoduro de propidio (IP) (Sigma) y se analizaron por citometría de flujo en el equipo FACSCalibur (BD, Heidelberg, Germany). La Anexina V es una proteína que se une a la fosfatidilserina presente normalmente en la cara interna de la membrana plasmática. Cuando la célula comienza un proceso apoptótico, este lípido queda expuesto en la cara externa de la membrana y la Anexina V se

puede unir. El yoduro de propidio se intercala en la molécula de DNA y es incapaz de atravesar la membrana celular. Por lo tanto el marcaje conjunto con yoduro de propidio (IP) y Anexina V permite diferenciar células vivas o viables (AnexinaV-/IP-) de las células apoptóticas tempranas (Anexina-V+/IP -) y de las apoptóticas tardías (AnexinaV+/IP +). Aproximadamente 3×10^5 células se lavaron con PBS frío y se resuspendieron en 100 μ l del tampón (BD Pharmingen) necesario para la unión de Anexina V, que contiene calcio. A continuación, esta suspensión celular se incubó con la Anexina V (10 μ l) y el IP (5 μ l) durante 15 minutos en oscuridad, y después de ese tiempo se añadió 400 μ l más del tampón y se analizó por citometría de flujo. Los resultados, expresados como porcentaje de células apoptóticas, son la media y desviación estándar obtenidos de tres tratamientos independientes de las líneas celulares con el inhibidor.

El ciclo celular también se estudió mediante citometría. Se incubaron las células durante 24 h con el inhibidor o con el vehículo (DMSO) y a continuación se lavaron dos veces con PBS frío y se fijaron muy lentamente con etanol frío a una concentración final del 66%. Después se hicieron varios lavados con PBS hasta eliminar el etanol, se resuspendieron las células en PBS y se incubaron con IP durante 15 minutos. Por último las células se analizaron inmediatamente por citometría.

2.6 Ensayo de inhibición de la expresión génica por RNA pequeño de interferencia (siRNA)

La línea celular MOLT4 se transfectó con siRNA para inhibir la expresión génica de Sirt1 y de Sirt2. Para la interferencia de Sirt1 se utilizaron 40nM de cada uno de los siRNA (12938-127 duo pack, Invitrogen) y para la interferencia de Sirt2, 2 μ g de cada uno de los siRNA (SI00301805 y SI0265471, QIAGEN). Se utilizó además un siRNA control cuya secuencia no se corresponde con ningún gen humano. El proceso de interferencia mediante siRNA se realizó mediante un sistema optimizado de electroporación desarrollado por Amaxa Biosystems (Cell Line Nucleofector Kit L). Dos días después de la electroporación, se añadió en el medio de cultivo el inhibidor de Sirtuinas a

estudio a la concentración apropiada y se dejó incubar durante otras 24 horas. La eficiencia de la inhibición de la expresión génica por siRNA se comprobó mediante ensayo western blot utilizando anticuerpos específicos contra Sirt1 y Sirt2.

2.7 Ensayo de tolerabilidad *in vivo* de los inhibidores en ratones inmunodeprimidos

Para este ensayo se utilizaron 10 hembras de ratones atímicos BALB/c nu/nu procedentes de Harlan Sprague-Dawley (Indianapolis, IN). Durante 5 días se les inyectó una dosis de 0.04 mg del inhibidor diluido en PBS con un 10% de DMSO en un volumen final de 200 μ l vía intraperitoneal. Los ratones se mantuvieron en condiciones libre de patógenos, según recomendaciones de la Federación científica europea de animales de laboratorio, y se les permitió acceso a comida y agua *ad libitum*. Se controló el consumo de comida y el peso de los animales dos veces por semana durante todo el tiempo que duró el ensayo, 34 días.

2.8 Western Blotting (WB)

El nivel de expresión de las proteínas de estudio se determinó mediante WB utilizando anticuerpos específicos (Tabla 3). Los extractos de proteínas totales se obtuvieron lisando las células con el tampón RIPA (1xPBS, 1% Nonidet P-40 (BDH), 0.5% deoxicolato sódico, 0.1% SDS) y en presencia de inhibidores de proteasas. Tras la adición del tampón de carga (Tris-HCl 0.25 M pH 6.8, SDS 6.5% (p/v), glicerol 25% (v/v), 2- β -mercaptoetanol 2 M y azul de bromofenol 0.02% (p/v)), las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (dodecilsulfato sódico) con un porcentaje adecuado de acrilamida, según el tamaño de la proteína analizada, que oscilaba entre el 6 y el 15% (p/v). Además de extractos proteicos totales, para el estudio de expresión de proteínas implicadas en la cascada apoptótica, se necesitaba separar y diferenciar las proteínas citoplasmáticas de las mitocondriales y de las de membrana. Para ello se utilizó el sistema de

extracción y separación proteica subcelular de Calbiochem (San Diego, CA, USA) siguiendo las indicaciones del protocolo. Una vez que las proteínas se separaron por electroforesis, se transfirieron a una membrana de PVDF (Polivinilidenofluoruro) de 45 μm de Immobilon-P (Millipore) previamente activada con metanol. Después se bloquearon los sitios inespecíficos de unión con un 5% de leche (DifcoTM) en PBS con 0.1% de Tween 20 (Sigma) (v/v) durante 1 hora. Tras el bloqueo las membranas se hibridaron con los anticuerpos correspondientes durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C, dependiendo del anticuerpo empleado. A continuación, tras lavar las membranas con PBS-Tween 0.1% se incubaron durante 1 hora con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa adecuado diluido en un 2% de leche en PBS-Tween 0.1%. Se utilizaron los anticuerpos anti- α -tubulina y anti- β -actina como controles de carga proteica. Antes del revelado de las uniones antígeno-anticuerpo, las membranas se volvieron a lavar con PBS-Tween 0.1%. Las proteínas se detectaron con los sistemas de quimioluminiscencia ECL y ECL Plus de Amersham (Enhanced Chemiluminescence Plus Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)) siguiendo las instrucciones del fabricante y se expusieron a películas fotosensibles de autorradiografía Ortho CP-G Plus films (Agfa) utilizando un intensificador de señal (ReflectionTM Intensifying Screen, DuPont).

Anticuerpo primario	Dilución usada	Casa comercial
anti-β-actina	1:10.000	Sigma-Aldrich
anti-α-tubulina	1:50.000	Sigma-Aldrich
anti-GAPDH	1:1000	Abcam
anti-tubulina acetilada	1:2000	Sigma-Aldrich
anti-p53	1:2000	Oncogene Sciences
anti-p53 acetilado en lys382	1:1000	Cell Signaling
anti-K16H4 acetilado	1:2000	Upstate
anti-Sirt1	1:1000	Cell Signaling
anti-Sirt2	1:1000	Abcam
anti-caspasa 3	1:1000	Cell Signaling
anti-citocromo c	1:1000	Cell Signaling
Anticuerpo secundario	Dilución usada	Casa comercial
Donkey-anti-rabbit-IgG	1:3000	Amersham Bioscience
Sheep-anti-mouse-IgG	1:3000	Amersham Bioscience

Tabla 3: Anticuerpos usados en Western Blotting

2.9 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Las histonas se obtuvieron del lisado celular por extracción ácida usando HCl (ácido clorhídrico) a una concentración de 0.25 M. A continuación se realizó la separación y purificación de los distintos tipos de histonas mediante cromatografía líquida de fase reversa en un sistema de Beckman Coulter. Para ello se utilizó una columna Jupiter C18 (Phenomenex, Inc.) y un gradiente de acetonitrilo del 20% al 60% y con un 0.3% de ácido trifluoroacético. El HPLC se utilizó como método preparativo para el posterior análisis de las distintas fracciones de histonas por HPCE, espectrometría de masas o WB.

2.10 Electroforesis capilar de alta resolución (HPCE)

La electroforesis capilar de alta resolución se utilizó para determinar los niveles de acetilación global de la histona H4, según protocolo descrito previamente en Fraga *et al.* (FRAGA *et al.* 2005b). La fracción correspondiente a la histona H4 que se había obtenido mediante HPLC, fue liofilizada y disuelta en 5 mM de DTT (ditiotreitól) para evitar así la oxidación de la muestra. Se utilizó un capilar de sílice fundida de 60.2 cm x 75 µm y una longitud de 50 cm en el equipo de electroforesis capilar P/ACE MDQ, de Beckman-Coulter. Las muestras se separaron en sus formas no acetilada, mono-, di-, tri- y tetra-acetiladas, gracias a este capilar y al tampón de separación, 100 mM de tampón fosfato a pH 2.0 con un 0.02% (p/v) de hidroxipropilmetil-celulosa (celulosa HPM), y sometida a un voltaje de 12 kV. Los datos obtenidos (media y desviación estándar) fueron el resultado de 3 experimentos independientes.

2.11 Espectrometría de masas *top-down*

Se utilizó el equipo APEX Qe Fourier (Bruker Daltonics Inc, MA, USA) equipado con un criomagneto refrigerado superconductor de 9,4 tesla y un fuente iónica de electrospray (Dual Source). Los espectros se calibraron externamente con arginina en el ion positivo en un rango de masa de 350 a

1400 m/z. Las soluciones de histonas se diluyeron a 1:20 en una solución que contenía un 50% de metanol y un 0.2% de ácido fórmico, y se introdujeron en la fuente iónica de electrospray usando una bomba con un flujo de 2 µl/min. Se adquirió en un rango de masa de 200 a 3000 m/z y después se procesaron los datos usando SNAP2 para la cuantificación.

2.12 Espectrometría de masas en tándem ESI-MS/MS (*electrospray ionization tandem mass spectrometry*)

Las histonas de las células tratadas con el inhibidor o con DMSO (control) se separaron en un gel de poliacrilamida con SDS al 18% y las bandas correspondientes a la histona H4 se cortaron y procesaron según protocolo previamente descrito por Villar-Garea *et al.* (VILLAR-GAREA *et al.* 2008) usando anhídrido propiónico para la acilación y tripsina para la digestión. Para el análisis por espectrometría de masas en tándem, la histona H4 se fragmentó por colisión inducida en el equipo Q-STAR XL instrument (PE-Sciex) ajustando manualmente la energía de colisión.

2.13 Cuantificación de la expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real

El estudio de la expresión génica de Sirt2 se realizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Se utilizó cDNA (DNA complementario) obtenido tras la transcripción inversa de RNA (obtenido con el reactivo Trizol siguiendo recomendaciones del fabricante) con el sistema High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) utilizando cebadores aleatorios (*random primers*). Para cada una de las reacciones de amplificación por PCR a tiempo real se utilizaron 40 ng del cDNA, 1 µl de la sonda y cebadores Taqman específicos para la amplificación de Sirt2 (Taqman® Gene Expression Assay, Cat no. Hs00247263 m1) y 10 µl de 2x Taqman® PCR Master Mix (Applied Biosystems) en un volumen final de 20 µl. En la reacción se utilizó como control negativo una muestra sin cDNA, H₂O y como control positivo cDNA de linfocitos normales. Las reacciones de PCR se realizaron en el equipo de PCR

cuantitativa a tiempo real 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Cada dato de expresión de Sirt2 se normalizó con el obtenido para el gen de expresión constitutiva utilizado en este estudio, el GAPDH. Todos los datos se obtuvieron por el análisis de tres experimentos independientes. Utilizamos el método de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ (Livak and Schmittgen 2001) para cuantificar la expresión relativa de Sirt2 en cada muestra, normalizando respecto al control endógeno, GAPDH.

2.14 Estudio de expresión génica mediante tarjetas microfluídicas (LDA, *low density array*)

Para estudiar la reactivación de los genes proapoptóticos debida a la acción de los inhibidores de sirtuinas se utilizaron arrays de expresión a nivel de RNAm previamente diseñados por Applied Biosystems. Estos arrays, que reciben el nombre de TaqMan® Low Density Array Human Apoptosis Panel, contienen sondas Taqman específicas para 96 genes, 93 implicados en el proceso apoptótico y 3 de ellos, genes control (GAPDH, β -actina y 18S). Para ello se extrajo el RNA de las células, antes y después del tratamiento con el inhibidor, mediante *Trizol Reagent* siguiendo las indicaciones del fabricante. A continuación se preparó el DNA complementario, que se introdujo en la tarjeta según las indicaciones del fabricante. Las reacciones de PCR cuantitativa a tiempo real mediadas por esta tarjeta se realizaron en el equipo Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System. Los datos obtenidos de cada uno de los genes de estudio fueron normalizados con dos genes control, GAPDH y β -actina. Se realizó una cuantificación relativa de la expresión de los genes apoptóticos de la muestra de células sometidas a tratamiento con inhibidor con respecto a la muestra control (células tratadas con el vehículo DMSO). Todos los datos se obtuvieron por el análisis de al menos dos experimentos independientes. Utilizamos el método de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ (Livak and Schmittgen 2001) para cuantificar la expresión relativa de cada gen en cada muestra, normalizando respecto a los controles endógenos, GAPDH y β -actina. Se consideró que un gen estaba sobre-expresado o infra-expresado si el

resultado de la relación (células tratadas/células control) era mayor a 1´5 o inferior a 0´5 respectivamente.

2.15 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChiP)

Esta técnica se realizó de acuerdo al protocolo previamente descrito en Fraga et al.(FRAGA *et al.* 2005b). Consta de varios pasos críticos para obtener un éxito en el resultado final. En primer lugar, las células se fijaron mediante formaldehído al 1% en PBS durante 15 minutos. La reacción de entrecruzamiento se detuvo añadiendo glicina a una concentración final de 0´125 M e incubando durante 5 minutos. En este proceso se forman puentes cruzados entre las proteínas y el DNA, necesarios para el proceso de inmunoprecipitación de la proteína de interés asociado a una región particular de DNA. A continuación las células se lisaron con un tampón adecuado que contiene SDS y el DNA se fragmentó en regiones de 0.25±1 kb mediante sonicación. El DNA sonificado se diluyó en un tampón adecuado y se procedió al bloqueo de sitios inespecíficos incubando las muestras durante 30 minutos con DNA de esperma de salmón con proteína A (Salmon sperm DNA/protein A Agarose-50% slurry, de Upstate). Después se inmunoprecipitó la cromatina con 5 µg del anticuerpo de interés (Tabla 4) durante toda la noche y en un medio tamponado adecuado. Además del anticuerpo de interés, se ha de inmunoprecipitar con anticuerpo anti-histona H3 total (usada como control positivo de la técnica) y con anticuerpo anti-IgG (usado como control negativo de la técnica). El complejo anticuerpo-antígeno-DNA se recogió usando las mismas bolitas de agarosa con proteína A usadas para el bloqueo y todo el conjunto se lavó varias veces usando distintos tampones con una concentración creciente en sales. A continuación se separaron las bolitas de agarosa del complejo anticuerpo-antígeno-DNA y se purificó el DNA (DNA output, bound o unido) previa proteólisis del complejo. La fracción de DNA no unida al complejo antígeno-anticuerpo (DNA input, unbound o no unido) también se purificó y se utilizó para el posterior análisis del DNA unido. El DNA unido a la proteína de interés fue analizado mediante PCR cuantitativa a tiempo real (ChiP cuantitativo).

Anticuerpo	Referencia	Casa comercial
anti-Sirt1	#2493	Cell Signaling
anti-H3	ab1791	Abcam
anti-IgG	ab46540	Abcam
anti-AcK16H4	07-329	Upstate
anti-AcH4	06-598	Upstate

Tabla 4: Anticuerpos utilizados en ChiP

2.16 ChiP cuantitativo

Esta técnica se utiliza para tratar de identificar los genes presentes en el DNA procedente del ChiP, que están unidos y bajo el control de la proteína de interés. Para ello, el DNA unido y no unido se amplificó por PCR usando cebadores específicos de genes concretos (Tabla 5). Las reacciones de PCR se realizaron en un equipo de PCR cuantitativa AbiPrism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) usando 20 ng de DNA, 5 pmol de cada oligo cebador y 6 μ l de 2xSYBRGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems) en un volumen final de 12 μ l. Todas las reacciones se hicieron en triplicado y los resultados se expresaron como factor de enriquecimiento, que se refiere al número de copias del gen de interés en la fracción de DNA unido después del ChiP con el anticuerpo apropiado, dividido por el número de copias del gen en el DNA no unido.

Para el análisis bioestadístico se utilizó el programa SPSS versión 13.0. Se utilizó el test de *t student* (para $n \geq 3$) para la comparación de las medias.

Gen	Secuencia de oligos	T (°C)
CASP8	Fw: 5'-ACAGTGCCAGGAAGTGAGAAAC-3'	60
	Rev: 5'-CAGATGCTCCAGAAATGCTAAT-3'	60
PUMA	Fw: 5'-GCGAGACTGTGGCCTTGTGTC-3'	60
	Rev: 5'-CGTTCCAGGGTCCACAAAGTCACGTG-3'	60
TNF	Fw: 5'-CCCTCCAGTTCTAGTTCTATC-3'	60
	Rev: 5'-GGGGAAAGAATCATTCAACCAG-3'	60
TNFRS10B	Fw: 5'-AAGCGGACTCTGAACCTCAA-3'	60
	Rev: 5'-TTTGTCTTCTGGGTCTGTCC-3'	60
SIRT2	Fw: 5'-AATGTGGATTCCAGGAGCTG-3'	60
	Rev: 5'-AAATCTGACTTCCGATGCTGA-3'	60
GAPDH	Fw: 5'-CAATCCCCATCTCAGTCGT-3'	60
	Rev: 5'-TAGTAGCCGGGCCCTACTTT-3'	60

Tabla 5: Cebadores utilizados en el ChIP cuantitativo. T temperatura de hibridación de oligos cebadores

2.17 Secuenciación de bisulfito

El material de partida necesario para el estudio por secuenciación de bisulfito de la metilación del DNA es el DNA modificado con bisulfito sódico. La extracción del DNA genómico de las distintas líneas celulares y de linfocitos y neutrófilos de sangre periférica se realizó mediante el sistema Blood DNA Extraction Kit (Qiagen) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. La modificación del DNA con bisulfito sódico se realizó según el protocolo descrito previamente por Herman *et al.* (HERMAN *et al.* 1996). Mediante el tratamiento con bisulfito sódico las citosinas no metiladas son modificadas a uracilos que tras amplificación por PCR pasan a ser timinas y son distinguibles de las citosinas metiladas, que son insensibles a tal modificación y permanecen como tales. Los cebadores utilizados para la amplificación del DNA modificado (Tabla 6) se diseñaron con el programa Methyl Primer Express (Applied Biosystems) de forma que no hibridasen con ninguna CpG y pudieran así amplificar por igual al DNA metilado y no metilado del promotor de Sirt2. Los productos de las amplificaciones por PCR fueron separados en gel de agarosa al 2% y

purificados de la banda de gel que los contenía mediante el sistema Ultra Clean GelSpin Kit (MO BIO Laboratories). Los amplicones fueron clonados en el plásmido pGEM-T Easy Vector (Promega) y se secuenció el DNA de unos 8-12 clones por amplicón mediante el sistema 3130x1 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Oligo	Secuencia	T (°C)
Forward	5'-TGTTGAGAGTTGTAGTTTTGTGTT-3'	58
Reverse	5'-CTAAACAACAACCCTCAAAATC -3'	58

Tabla 6: Cebadores utilizados en la reacción de secuenciación de bisulfito de Sirt2. T temperatura de hibridación.

2.18 Pirosecuenciación

La pirosecuenciación es un método cuantitativo exacto de alta resolución para determinar la relación C/T de cada una de las posiciones metiladas o no del DNA de estudio. Este método se desarrolla utilizando como material de partida el DNA modificado con bisulfito que nos permitirá distinguir el DNA metilado del que no lo está. En primer lugar se amplificó mediante PCR la región de interés, el promotor de Sirt2, utilizando cebadores específicos (Tabla 7) previamente diseñados con el Pyrosequencing™ Assay Design Software, User Manual version 1.0.6 AA (Biotage AB). Uno de los cebadores utilizados en la amplificación ha de estar biotinilado. Las moléculas de biotina presentes exclusivamente en el fragmento amplificado se utilizaron para el aislamiento del amplicón de interés mediante la unión con bolitas de sefarosa marcadas con estreptavidina (Amersham Biosciences). Una vez purificados los productos de PCR se desnaturalizaron a 80°C durante 5-10 minutos (dependiendo del tamaño del amplicón) y se hibridaron a temperatura ambiente con el cebador necesario para la pirosecuenciación. La reacción de pirosecuenciación se realizó en el PSQ™ HS 96 System (Biotage AB) utilizando una mezcla de reacción que continúa 4 enzimas fundamentales en el proceso: el fragmento Klenow de la DNA Pol I (*E. coli*), una ATP sulfurilasa (*Saccharomyces cerevisiae*), la luciferasa (*Photinus pyralis*) y una apirasa (*Solanum tuberosum*).

El pirofosfato PP_i liberado tras la incorporación de un desoxinucleótido a la reacción era transformado en ATP por la ATP sulfurilasa usando ADP como sustrato. La energía procedente de esta reacción la utilizaba la luciferasa para oxidar la luciferina y emitir un fotón detectado a una longitud de onda de 560 nm. Como el nucleótido dATP se usa como sustrato natural de la luciferasa para la incorporación a la reacción de secuenciación se utiliza un nucleótido de ATP modificado, S-dATP. Los nucleótidos que no se incorporaban eran degradados por la apirasa antes de que se incorporase un nuevo nucleótido. Todos los fotones emitidos durante la reacción de secuenciación se detectaron por una cámara CCD (charge-coupled device) y se podía ver a tiempo real la secuencia del DNA de estudio. Los datos fueron analizados con el programa Pyro Q-CpG (Biotage AB) y obtuvimos un porcentaje de metilación del DNA específico para cada CpG según la intensidad de la señal alcanzada tras la incorporación de una dCTP (DNA metilado) o de una dTTP (DNA no metilado).

Oligo	Secuencia del oligo	T (°C)
Forward	5'-GGGAGTGGGATTTTGAGG-3'	60
Reverse	5'-Bio-CCTCTAACAATCAAATACCCATAA-3'	60
Sequencing	5'-GGAGTGGGATTTTGAG-3'	RT

Tabla 7: Cebadores utilizados en la reacción de pirosecuenciación del promotor de Sirt2. RT: temperatura ambiente

RESULTADOS

A) Estudio previo de un panel de compuestos inhibidores de Sirtuinas

1- Inhibición *in vitro* de la actividad enzimática de Sirt1 y Sirt2

En colaboración con el Dr. Antonello Mai, diseñamos y sintetizamos compuestos capaces, *a priori*, de inhibir a Sirt1 y Sirt2.

Para determinar *in vitro* la capacidad inhibidora real de los compuestos sintetizados, analizamos las actividades enzimáticas de Sirt1 y Sirt2 en respuesta al tratamiento con las nuevas drogas utilizando un ensayo de fluorescencia. Utilizamos como compuesto de referencia el Sirtinol, que tiene una actividad inhibidora *in vitro* más potente sobre la actividad enzimática de Sirt2 que de Sirt1.

Cuando se estudió la inhibición *in vitro* de los 10 compuestos pudimos observar que cada uno tenía un patrón diferente de inhibición sobre Sirt1 y Sirt2 (Tabla 1).

Los datos indicaron que había 2 compuestos (MC1775 y MC2319) que presentaban una actividad sobre la inhibición *in vitro* de Sirt1 significativamente superior a la del Sirtinol, presentando porcentajes de inhibición cercanos al 80% cuando son utilizados a una concentración de 25 y 50 μ M respectivamente. En cambio, estas mismas tasas de inhibición, cercanas al 80%, la presentaron otros cuatro compuestos, MC1776, MC1793, MC1801 y MC1808, en la inhibición de Sirt2 cuando se utilizaban a una concentración de 25 μ M.

Además, observamos que los compuestos MC2139 y MC2140 no inhibían *in vitro* significativamente ni a Sirt1 ni a Sirt2.

Compuesto	% actividad residual	
	SIRT1	SIRT2
Sirtinol	80 ± 8	50.8 ± 4.3
MC1591	80.1 ± 8.3	26.2 ± 3.7
MC1775	19.2 ± 2.9	36.5 ± 3.6
MC1776	92.3 ± 2.4	19.9 ± 2.1
MC1793	68.4 ± 5.1	18.1 ± 1.1
MC1800	43.7 ± 3.1	20.8 ± 2.4
MC1801	39.79 ± 4.7	15.09 ± 3.8
MC1808	72.65 ± 5.9	12.6 ± 2.3
MC2139*	70.79 ± 7	93.2 ± 5.2
MC2140*	70 ± 5.3	81.35 ± 4.4
MC2319*	19.3 ± 6.7	75.79 ± 8.9

Tabla 1: Actividad enzimática residual de Sirt1 y Sirt2 tras la incubación a una concentración de 25 µM de los compuestos a estudio. *Estos compuestos se utilizaron a una concentración de 50 µM.

2- Estudio de apoptosis celular

Para estudiar los mecanismos a través de los cuales los nuevos compuestos producen muerte celular, se estudió la capacidad de inducción de apoptosis de estos compuestos mediante el ensayo de Anexina V/IP en la línea tumoral de leucemia U937 y a una concentración final de 25 µM.

Todos los compuestos estudiados provocaron más de un 20% de apoptosis en el cultivo de U937 después de 40 horas de tratamiento. Sólo había tres compuestos que no siguieron esta pauta, MC2139, MC2140 y MC2193, que aún siendo utilizados a mayor concentración (50 µM) y durante más tiempo (50 horas) no presentaban efectos aparentes sobre la apoptosis de la línea celular U937 (Figura 1). Por el contrario otros tres compuestos destacaban por su potente actividad apoptótica, MC1591, MC1775 y MC1776, que exhibían tasas de apoptosis superiores al 50% en la línea celular tumoral

estudiada cuando eran utilizados durante 40 h y a una concentración final en el cultivo de 25 μ M.

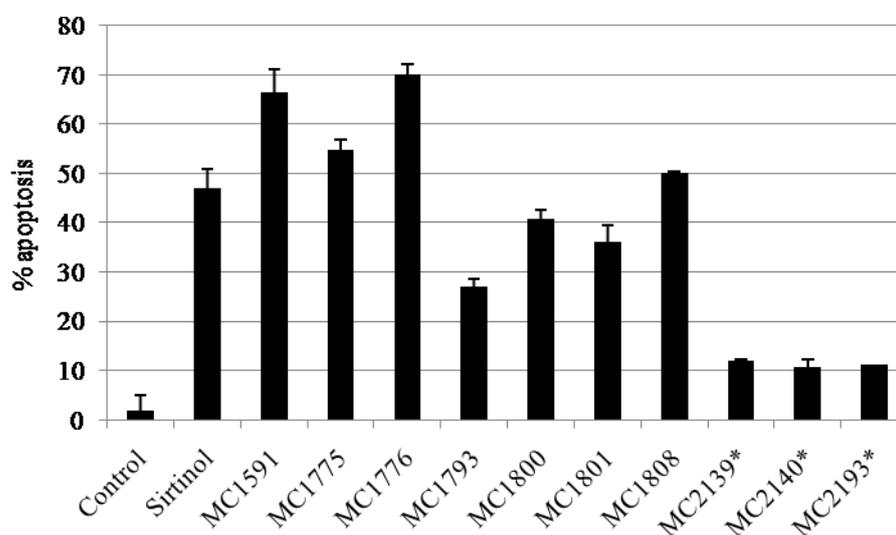


Figura 1: Porcentaje de células U937 que están en apoptosis tras 40 horas de tratamiento con los compuestos a una concentración final de 25 μ M. * Estos compuestos fueron utilizados a una dosis de 50 y durante 50 horas de tratamiento.

3- Efectos en la diferenciación celular de la línea U937

La diferenciación celular de líneas tumorales que pueden ejercer ciertos HDACi, como TSA, NaB o SAHA, proporciona una vía de ataque al proceso tumoral. Se ha descrito previamente que la línea celular U937 es capaz de diferenciar a macrófagos bajo el estímulo de ciertos compuestos, como receptores nucleares hormonales (vitamina D y ácido retinoico), factores de crecimiento (factor de crecimiento 1 y factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos) y HDACi, tales como el ácido valproico (VPA) que induce diferenciación a dosis de 0.25 mM a 1mM. Esta diferenciación se ve reflejada por la expresión de marcadores específicos de la serie monocítica, como el CD11 o el CD64. Por este motivo, se decidió estudiar el posible efecto diferenciador de los nuevos compuestos sobre U937 mediante el análisis por citometría de flujo de CD11.

De todos los compuestos con un posible papel inhibidor de Sirtuinas solamente 4 de ellos presentaron la capacidad de diferenciar a las células U937 con una mayor eficiencia que el control usado en el ensayo. Los 4

compuestos capaces de producir diferenciación de células tumorales fueron: MC1591, MC1775, MC1776 y MC1808 (Figura 2).

Por el contrario había 3 compuestos, MC2139, MC2140 y MC2193, que parecían tener un efecto opuesto a la diferenciación celular, ya que presentaban porcentajes de células CD11+ inferiores al control, aún siendo utilizados durante más tiempo (50 h) y a una mayor concentración (50 μ M) que los anteriores.

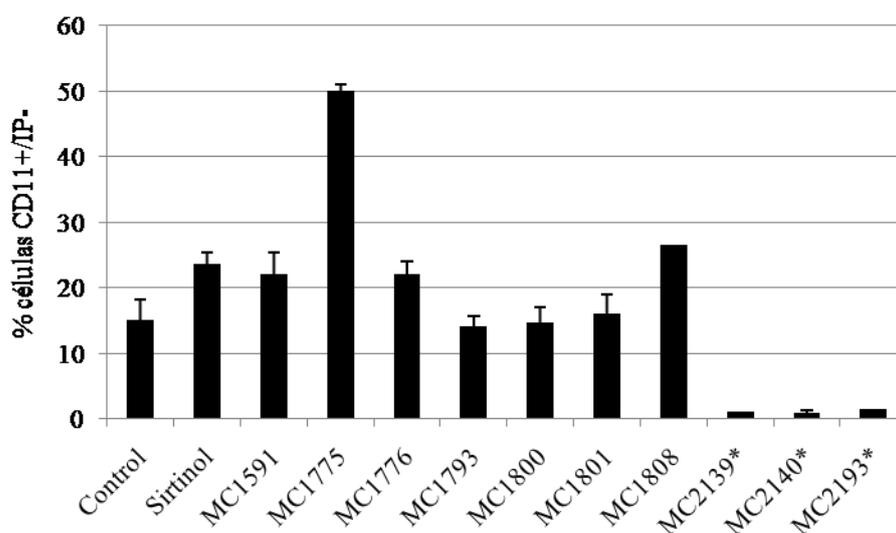


Figura 2: Porcentaje de células U937 positivas para CD11 que muestran características de diferenciación celular tras 40 horas de tratamiento con los compuestos a una concentración final de 25 μ M. * Estos inhibidores fueron utilizados a una dosis de 50 y durante 50 horas de tratamiento.

4- Efectos sobre la viabilidad celular

Con la finalidad de profundizar en los efectos que estos compuestos podrían ejercer sobre el crecimiento de las líneas tumorales, se realizó un ensayo de MTT sobre líneas tumorales de distinto origen para determinar si el espectro de acción abarcaba a otros tumores distintos de los sanguíneos. Para ello se utilizaron líneas tumorales derivadas de cáncer de mama (MDA-MB-231), de cáncer de colon (RKO o SW480) y de leucemia (MOLT4). El estudio de proliferación celular mediante MTT se realizó durante un periodo de 72 horas, tomando datos cada 24 horas y utilizando la misma concentración final

del compuesto inhibidor usada previamente en los ensayos de inhibición *in vitro*, apoptosis y diferenciación celular.

Este ensayo nos mostró que, en primer lugar, el Sirtinol no ejercía ninguna actividad antiproliferativa sobre las tres líneas tumorales estudiadas. Además, los compuestos MC1800, MC2139, MC2140 y MC2193 no tenían ningún efecto aparente sobre la proliferación celular de líneas tumorales derivadas de colon, mama y leucemia (Figura 3). Esto concordaba con los datos obtenidos previamente de la apoptosis producida en U937 para los compuestos MC2139 y MC2140, en donde no se veía ningún efecto. En cambio, para MC1800 se había determinado que provocaba un 40% de apoptosis en el cultivo de U937 y en el ensayo de proliferación no se observa ningún efecto sobre la línea de leucemia empleada, MOLT4, lo cual parecía indicar que el efecto apoptótico mediado por MC1800 dependía del tipo celular empleado y no era extensible al resto de líneas tumorales de igual origen. El compuesto MC2193 además de no tener actividad negativa sobre la viabilidad celular de las tres líneas tumorales utilizadas en el estudio, incluso aparentaba tener un ligero efecto positivo sobre la proliferación celular

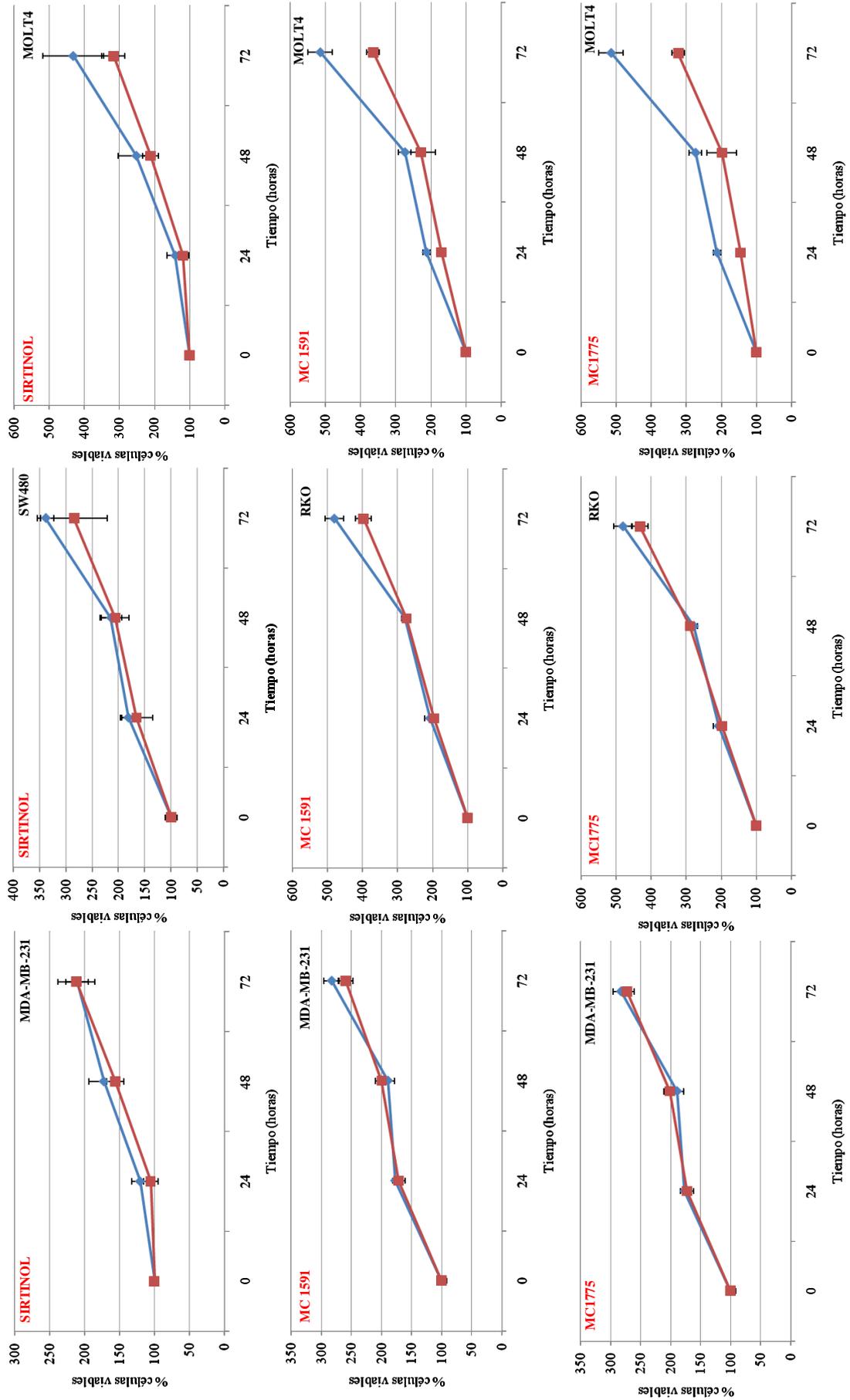
En cambio, los compuestos MC1591, MC1775, MC1793 y MC1808 no presentaban efectos antiproliferativos sobre las líneas de tumores de mama y colon estudiadas. Sin embargo, actuaban sobre MOLT4 produciendo un descenso en la proliferación celular que alcanzaba niveles próximos al 50% en el caso de MC1793 (Figura 3).

El compuesto MC1801 afectó a la viabilidad celular de SW480 y de MOLT4 tras las 48 horas de tratamiento. En SW480 el descenso en la tasa de viabilidad celular parecía recuperarse a las 72 horas de tratamiento, mientras que para MOLT4 el efecto continuaba estable a las 72 horas, alcanzando una reducción de viabilidad cercana al 50% respecto al control.

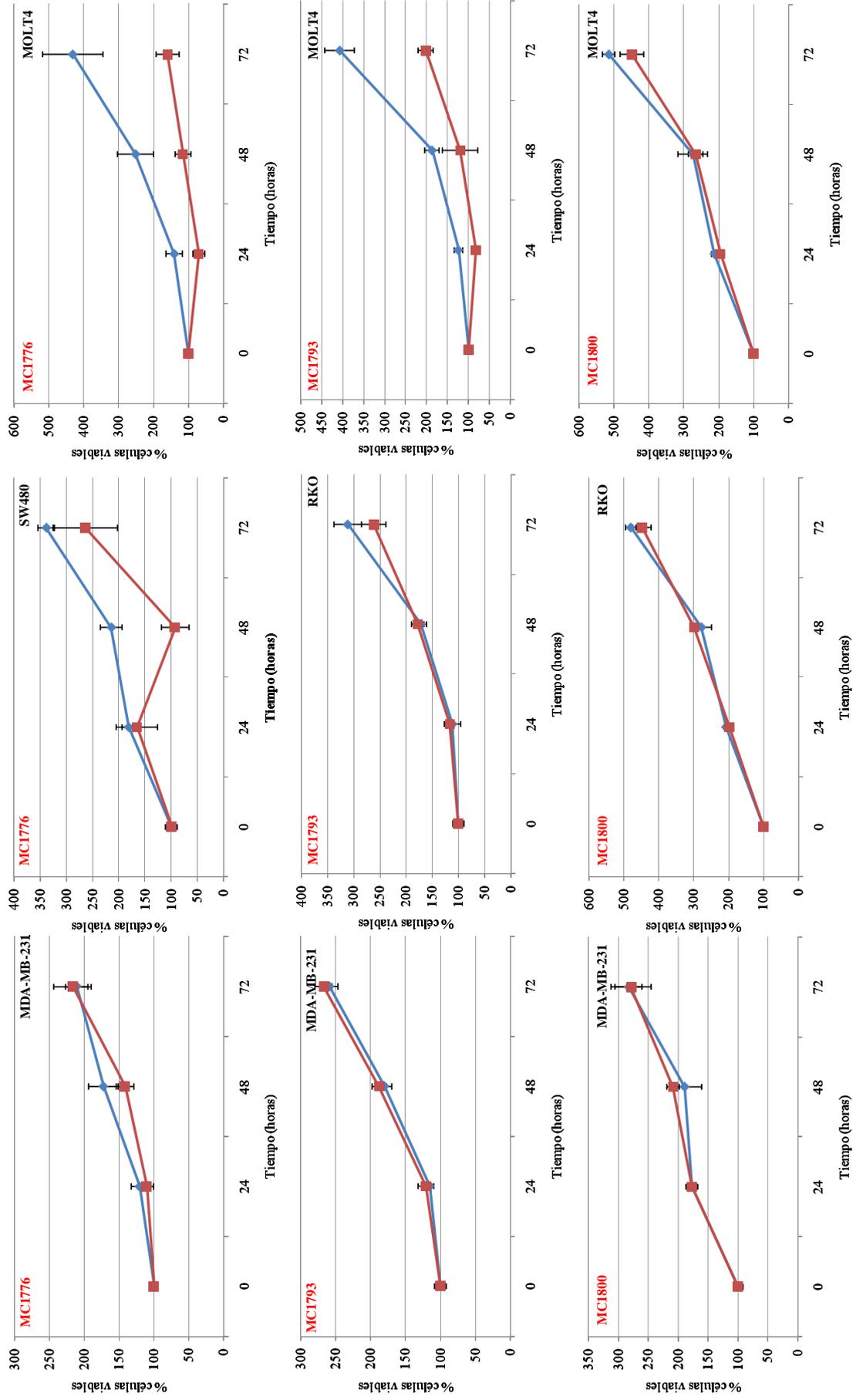
Sin embargo, había un compuesto, MC1776, que mostraba un efecto antiproliferativo en todas las líneas tumorales estudiadas. El efecto más potente se observaba en la línea MOLT4, en donde se producía un descenso en el número de células viables de aproximadamente un 50% durante todo el tiempo que duró el ensayo. En cambio, para las líneas de mama y colon el efecto era más evidente tras las 48 horas de tratamiento con el inhibidor, que incluso en la

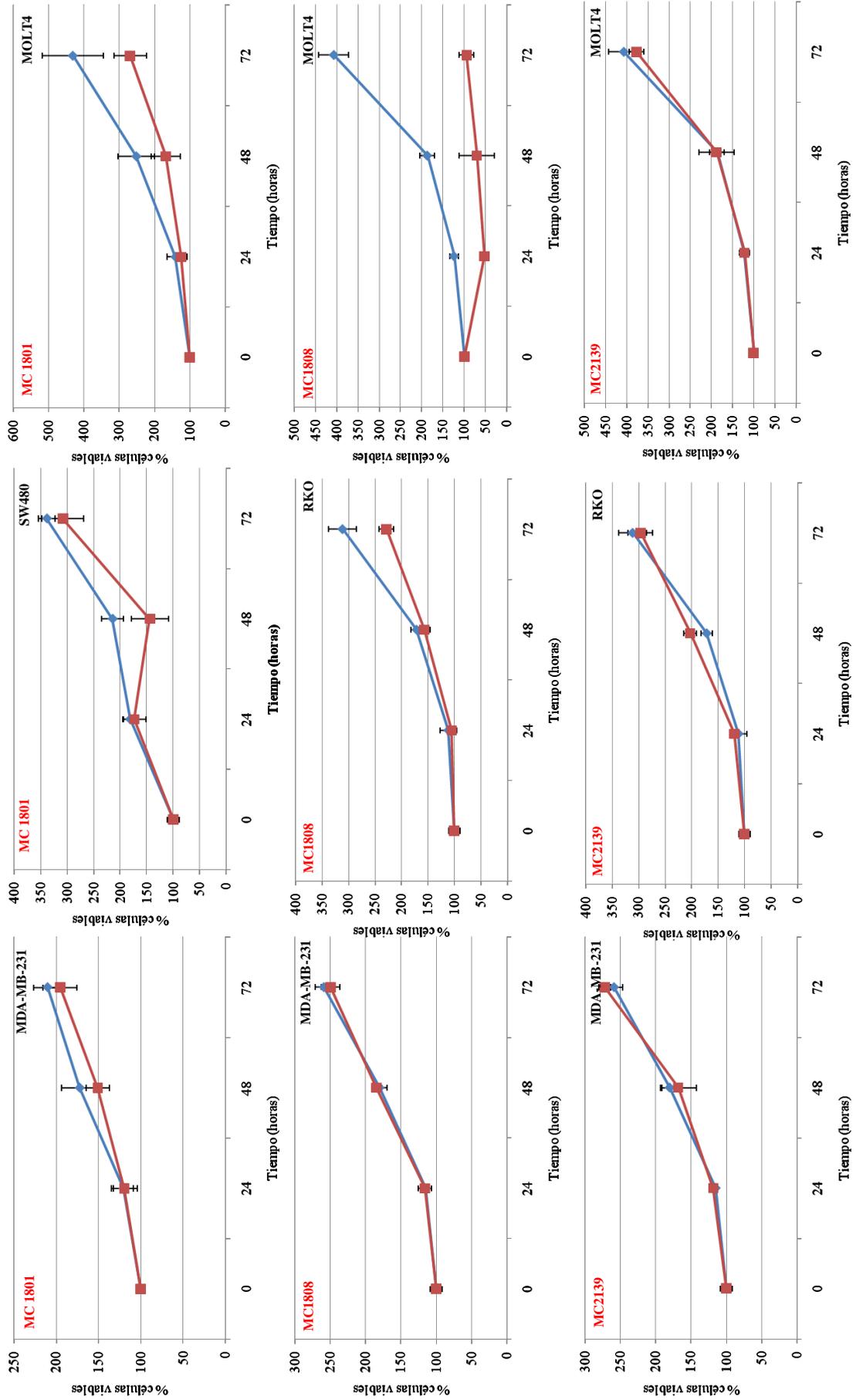
línea de cáncer de colon SW480 producía un descenso de viabilidad celular del 50% (Figura 3).

Resultados



Resultados





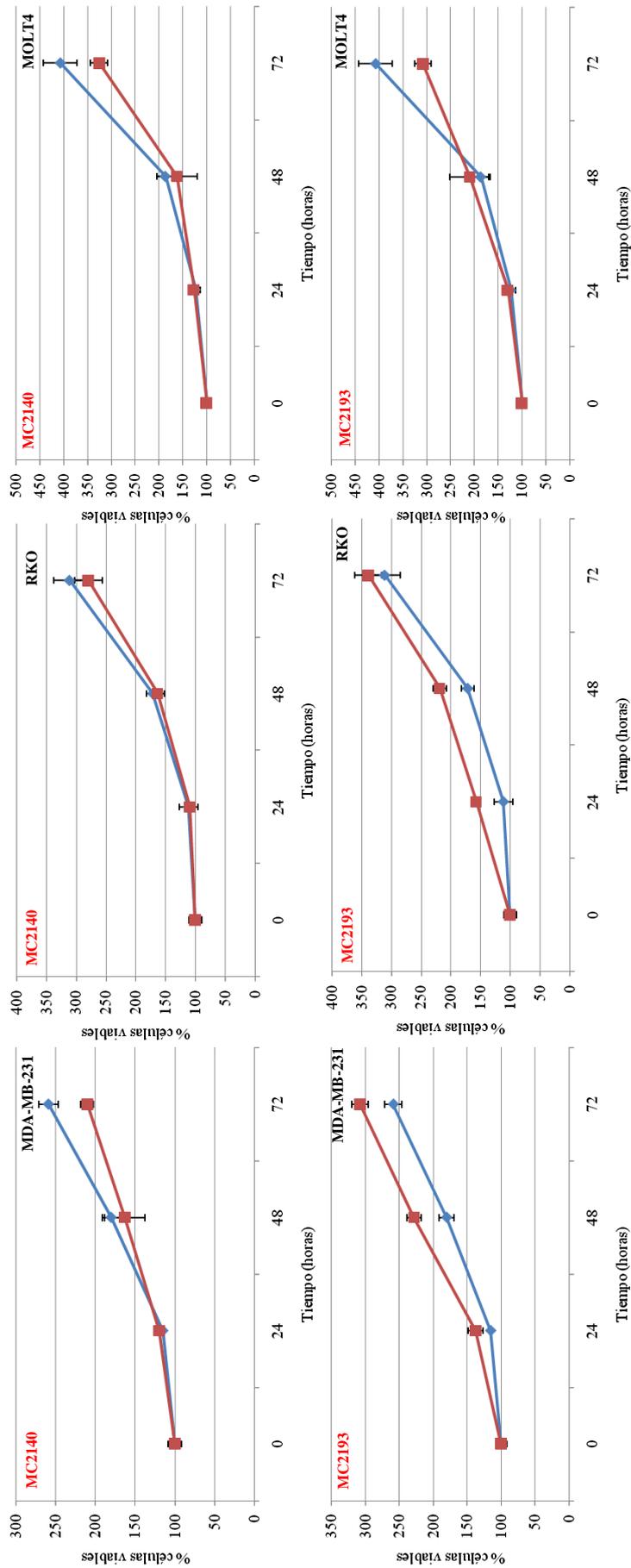


Figura 3: Ensayo de MTT. Proliferación celular de cuatro líneas tumorales (MDA-MB-231, RKO, SW480 y MOLT4) cuando se tratan con el compuesto inhibidor a una concentración final de 25 μ M. La concentración final usada para los compuestos MC2139, MC2140 y MC2193 es de 50 μ M. La línea azul muestra la viabilidad de las células control (sin inhibidor, sólo con el vehículo DMSO) y la línea roja indica la proliferación de la línea tratada con el inhibidor de Sirtuinas correspondiente.

5- Resumen

La evaluación antitumoral de los 10 compuestos fue realizada a distintos niveles, inhibición *in vitro* de las actividades enzimáticas de Sirt1 y Sirt2 y efecto sobre la apoptosis, diferenciación y proliferación celular de líneas tumorales. Ya que el objetivo de este estudio era encontrar un compuesto capaz de inhibir la actividad enzimática de Sirt1 y Sirt2 y que tuviera un fuerte efecto antiproliferativo y apoptótico sobre líneas celulares tumorales de distinto origen, el estudio de proliferación celular nos hizo descartar 5 compuestos (MC1591, MC1800, MC2139, MC2140 y MC2193) que no tenían actividad sobre las líneas tumorales empleadas. De los 5 restantes (MC1775, MC1776, MC1793, MC1801 y MC1808) decidimos profundizar el estudio de MC1776 ya que *a priori* tenía características interesantes como agente antitumoral.

MC1776 presentaba una alta tasa de inhibición enzimática de Sirt2 a bajas concentraciones, aunque no se debía excluir su efectividad sobre Sirt1 a dosis más elevadas. Además, provocaba un alto porcentaje de apoptosis sobre la línea tumoral U937 y era el único inhibidor que tenía un amplio espectro de acción en la proliferación de líneas tumorales, afectando al crecimiento de líneas derivadas de cáncer de mama, colon y leucemia.

El compuesto MC1776 fue designado Salermide y se prosiguió con un estudio detallado de su estructura, su capacidad antitumorigénica y sus mecanismos de acción.

B) Caracterización de Salermide como posible agente antitumoral

1- Análisis estructural del mecanismo de inhibición de Sirtuinas por Salermide

Realizamos un estudio de modelaje y acoplamiento tridimensional para Salermide mediante el programa GOLD. Todas las combinaciones de acoplamiento entre Salermide y Sirt2 que proponía el programa convergían en la misma área y en el mismo modo de unión e implicaban a los mismos residuos. En cambio, en un estudio paralelo que se efectuó con el Sirtinol, el programa ofrecía varias posibilidades y se escogieron las cinco primeras con una puntuación de acoplamiento más alta para el estudio comparativo entre Salermide y Sirtinol. El modelo de acoplamiento que obtenía la mejor puntuación para Salermide y los 5 modelos con mejor puntuación para Sirtinol fueron usados en el programa AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement) para minimizar la energía de unión entre ligando (Salermide o Sirtinol) y enzima (Sirt2). Mediante la utilización de este programa se describió un modelo para el acoplamiento entre Sirtinol y Sirtuina muy similar al propuesto para Salermide. La energía de interacción entre Salermide y Sirt2, obtenida después de la minimización, fue de -56.95 Kcal/mol y de -44.61 Kcal/mol para el complejo formado por Sirtinol y Sirt2. Esta diferencia de 12 Kcal/mol sugería que Salermide era un inhibidor de Sirt2 más potente que el Sirtinol. La mayor afinidad de unión entre Salermide y Sirt2 podía deberse, al menos en parte, a una interacción polar entre el grupo carbonil amídico y la Gln 167, interacción que el Sirtinol no tenía con Sirt2 (Figuras 4 y 5).

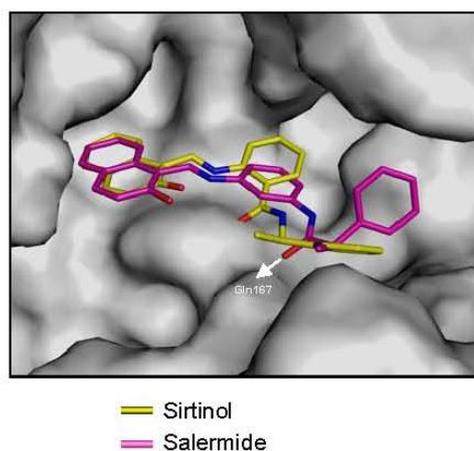


Figura 4: Estructura de los complejos formados por el Sirtinol y Salermide con Sirt2. La flecha blanca señala la interacción polar entre el grupo carbonilo de la amida de Salermide y la Gln167 de Sirt2, interacción ausente para el caso del Sirtinol.

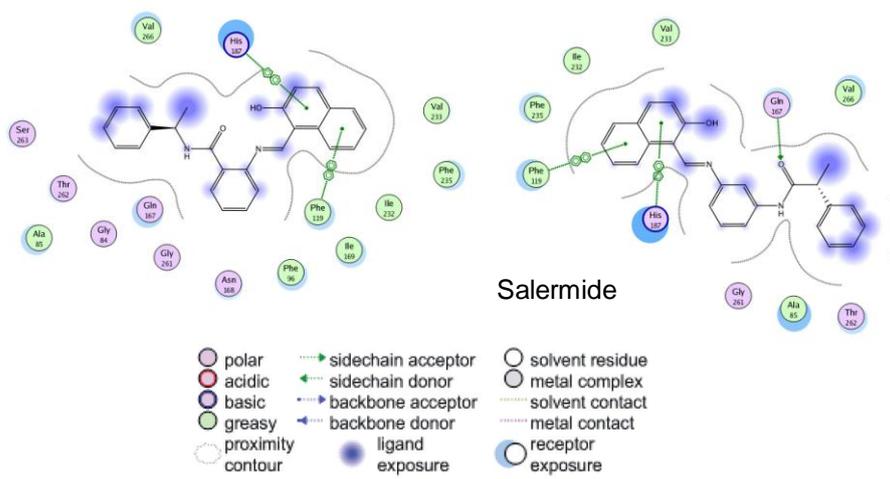


Figura 5: Interacciones propuestas obtenidas tras los estudios de modelaje y acoplamiento para el Sirtinol y Salermide.

2- Síntesis de Salermide

Salermide (N- {3-[(2-hidroxi-naftaleno-1-ylmetileno)-amino]- fenil} -2-fenil-propionamida) se sintetizó por condensación entre 2-hidroxi-1-naftaldehído y N-(3-amino-fenil)-2-fenil-propionamida (ambos compuestos disponibles en el mercado). La reacción de condensación entre ambos compuestos para originar Salermide fue llevada a cabo a través de otra reacción, ácido 2-fenilpropiónico activado con el reactivo BOP con 1,3-fenilenediamina, bajo condiciones básicas y a temperatura ambiente (Figura 6).

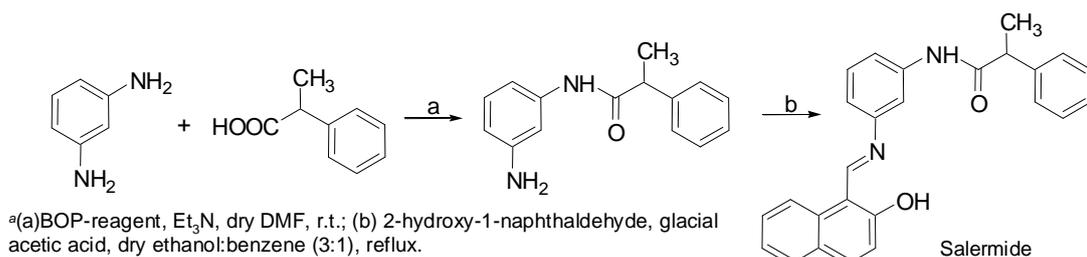


Figura 6: Síntesis de Salermide.

3- Inhibición *in vitro* de Sirt1 y Sirt2 mediada por Salermide

Analizamos el potencial inhibitorio de Salermide sobre Sirt1 y Sirt2 mediante un ensayo de fluorescencia. Incubamos distintas dosis del compuesto con plásmidos recombinantes que contenían Sirt1 y Sirt2 humanas y medimos la actividad de desacetilación mediante un el ensayo *Fluor de Lys*. Utilizamos Sirtinol como droga de referencia en este estudio.

Salermide exhibió una capacidad inhibitoria de aproximadamente el 80% sobre Sirt1 a una concentración de 90 μ M, mientras que inhibió a Sirt2 en la misma proporción (80%) a una concentración inferior, de 25 μ M (Figura 7). En cambio, el efecto mostrado por Sirtinol en las mismas condiciones de concentración se correspondió a una inhibición menor del 5% sobre Sirt1 y a una falta de inhibición sobre Sirt2 (Figura 7). El estudio detallado de la actividad de Salermide sobre Sirt1 nos indicó que a una dosis de 100 μ M del compuesto se producía una inhibición de más del 80% de actividad (Figura 8).

Estos datos, junto con los obtenidos por las técnicas de modelaje tridimensional y acoplamiento, nos confirmaban que Salermide era un inhibidor más eficaz que Sirtinol sobre la actividad enzimática de Sirt1 y Sirt2 en experimentos *in vitro*.

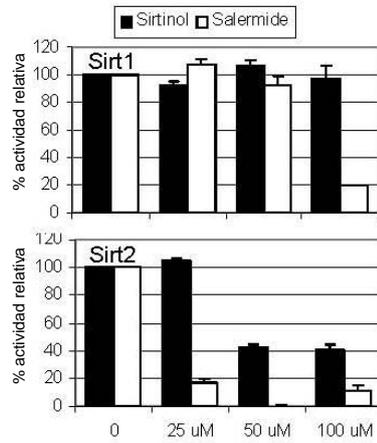


Figura 7: Inhibición *in vitro* de Sirt1 y Sirt2 mediada por Salermide o Sirtinol. Los resultados están expresados como actividad relativa de los extractos proteicos tratados con el inhibidor con respecto a los no tratados.

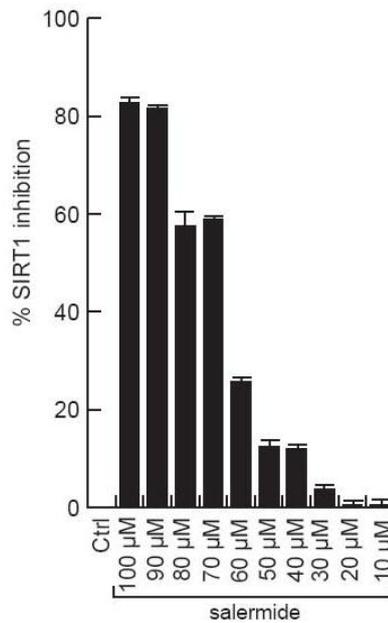


Figura 8: Inhibición específica de Sirt1 tras la incubación del extracto proteico con dosis crecientes de Salermide, desde 0 uM (Ctrl) a 100 uM.

4- Efectos de Salermide sobre la viabilidad celular

Con la finalidad de determinar el efecto que causaba Salermide sobre la viabilidad de células tumorales realizamos un ensayo de MTT. En este estudio utilizamos líneas tumorales humanas derivadas de distintos tipos tumorales y una línea celular no tumorigénica que nos permitiera descartar un posible efecto tóxico en células humanas normales. Las líneas celulares tumorales usadas en el estudio fueron MOLT4, KG1A, K562, RAJI, SW480 y MDA-MB-231, mientras que la línea no tumorigénica fue MRC5.

El tratamiento con Salermide a una concentración final de 100 μ M durante 24 horas produjo un descenso del número de células vivas en las líneas tumorales, mientras que en la línea no tumorigénica MRC5 no causó dicho efecto (Figura 9). También observamos que el efecto que Salermide causaba sobre la proliferación celular dependía del tipo celular. Salermide provocó un efecto antiproliferativo más intenso sobre la viabilidad del cultivo en las líneas derivadas de leucemias y linfomas. Tras 24 horas de tratamiento con Salermide y a una dosis de 100 μ M, las líneas celulares MOLT4, KG1A, K562, MV4-11 y RAJI presentaron aproximadamente un 50% de descenso en el porcentaje de células vivas. En KG1A y K562 se produjo un descenso incluso mayor, alcanzando porcentajes del 65% de reducción de células vivas en el cultivo (Figura 10). Sin embargo, el efecto causado por Salermide sobre la viabilidad del cultivo en las mismas condiciones de concentración y tiempo de acción fue menos evidente en las líneas tumorales procedentes de cáncer de mama y colon. En la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231 se produjo un descenso de aproximadamente el 25% de la población celular, mientras que en SW480, derivada de cáncer colorrectal, el descenso alcanzó un 35% (Figura 9). En cambio, Salermide no produjo un descenso en el número de células viables del cultivo a dosis de 100 μ M y durante 24 horas en la línea no tumorigénica empleada en este estudio, MRC5. Asimismo, es importante destacar que el efecto producido por Salermide sobre la proliferación de líneas tumorales dependía de la dosis administrada al cultivo.

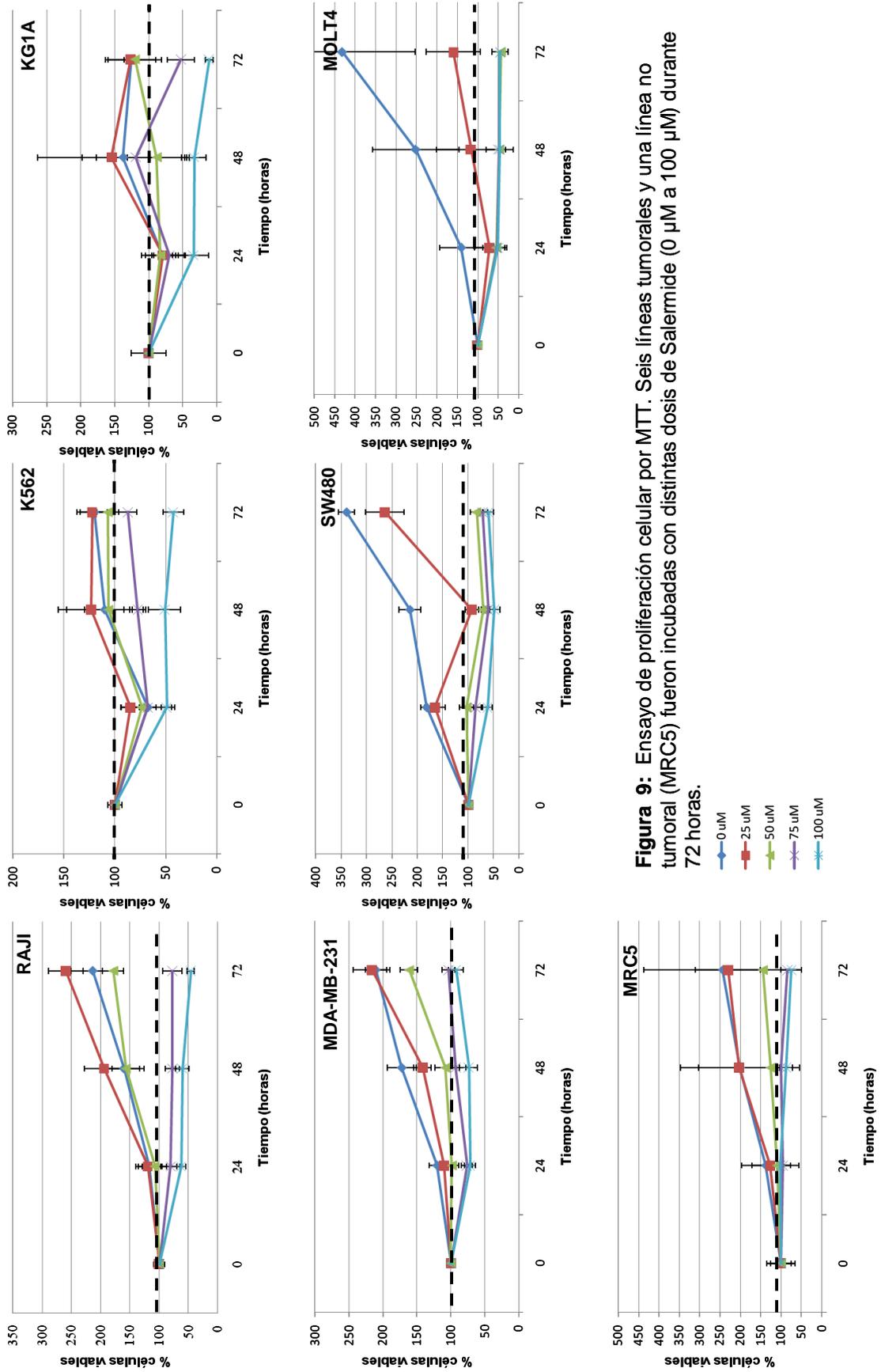


Figura 9: Ensayo de proliferación celular por MTT. Seis líneas tumorales y una línea no tumoral (MRC5) fueron incubadas con distintas dosis de Salermide (0 µM a 100 µM) durante 72 horas.

● 0 µM
 ■ 25 µM
 ▲ 50 µM
 ▼ 75 µM
 ◆ 100 µM

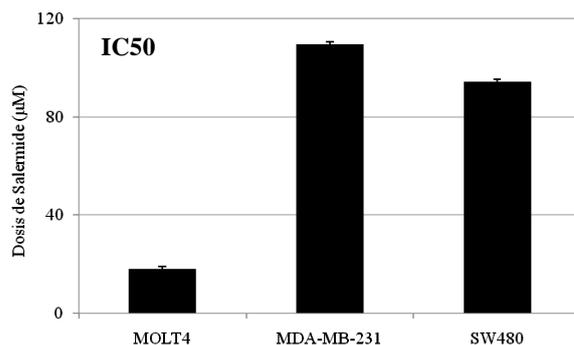


Figura 10: IC50 de Salermide

Calculamos, el IC50 (concentración del inhibidor a la cual disminuye al 50% la población del cultivo celular) sobre MOLT4, MDA-MB-231 y SW480 utilizando el ensayo de MTT. Salermide presentó un IC50 considerablemente inferior en la línea tumoral procedente de leucemia (MOLT4) que en las líneas derivadas de cáncer de mama (MDA-MB-231) y colon (SW480) (Figura 10).

Así pues, se podía corroborar, junto con los datos procedentes de MTT, que Salermide presentaba un efecto antitumoral más potente en tumores sanguíneos que en el resto de los estudiados.

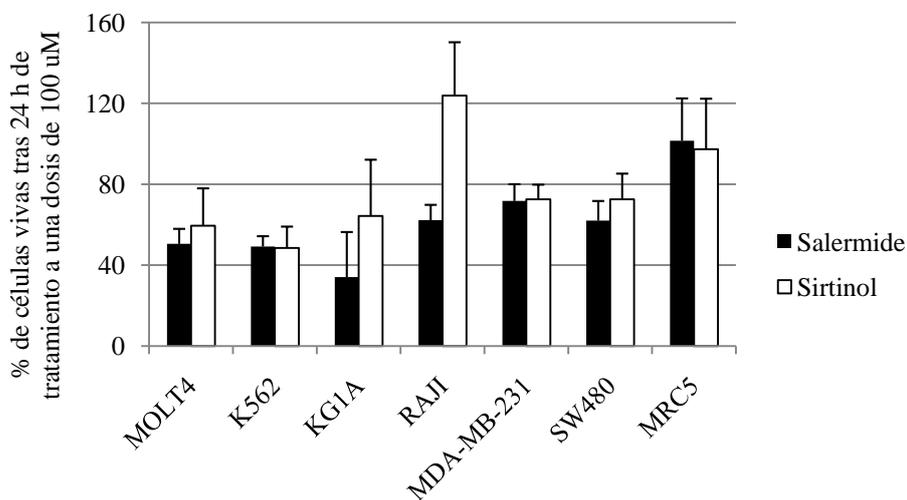


Figura 11: Viabilidad celular tras la incubación con Salermide o Sirtinol durante 24 h a una concentración de 100 µM.

A continuación comparamos el efecto en la viabilidad celular producido por Salermide y por Sirtinol. Salermide presentó un efecto sobre la viabilidad

celular más potente que el Sirtinol en casi todas las líneas estudiadas, siendo evidente en las líneas de leucemias y linfomas (Figura 11) cuando fueron utilizados en las mismas condiciones.. Después de 72 horas de incubación con Salermide a una dosis de 100 μ M, solamente el 10% de las células de la línea KG1A y el 50% de K562 y RAJI permanecieron viables, mientras que a iguales condiciones de tratamiento con Sirtinol, el efecto observado fue mucho menor, el 60% de células KG1A y el 95% de células K562 y RAJI permanecieron viables (Tabla 2).

Resultados

MOLT4												
Salermide		0 μ M		25 μ M		50 μ M		75 μ M		100 μ M		
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
0 h	100	9.35901701	100	9.35901701	100	9.35901701	100	9.35901701	100	9.35901701	100	9.35901701
24 h	140.857548	23.1623831	70.6354831	16.8855459	54.0987479	6.1428783	52.4450744	6.1331476	50.55516182	7.411994601	45.59414127	5.347373435
48 h	251.712733	52.2055274	115.993385	22.545262	47.2478148	6.05618381	47.7202929	7.65944917	46.0666194	4.30898471	45.83038034	5.369470792
72 h	431.667848	86.9477305	159.697614	33.4234269	43.2317505	4.75253364						
Sirtinol		0 μ M		25 μ M		50 μ M		75 μ M		100 μ M		
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
0 h	100	9.35901701	100	9.35901701	100	9.35901701	100	9.35901701	100	9.35901701	100	9.35901701
24 h	140.857548	23.1623831	119.300732	15.3118695	60.9496811	9.64708872	59.0597685	18.2088598	59.53224663	18.50140977	45.59414127	5.347373435
48 h	251.712733	52.2055274	211.197732	53.625493	64.020789	6.80674004	46.5390976	5.43576286	45.59414127	4.673968075	45.83038034	5.369470792
72 h	431.667848	86.9477305	317.505315	42.2972814	94.4956296	25.9120179	48.4290102	7.01889137	46.06661942	5.726419155		
K562												
Salermide		0 μ M		25 μ M		50 μ M		75 μ M		100 μ M		
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
0 h	100	6.67614289	100	6.67614289	100	6.67614289	100	6.67614289	100	6.67614289	100	6.67614289
24 h	67.6890959	26.2749359	84.7652695	9.62074665	73.7380226	7.48267454	67.6088004	8.25322364	49.22113377	5.101177534	45.59414127	5.347373435
48 h	109.837535	37.4734465	123.440929	32.0703711	106.391521	23.5402992	77.5119105	7.94043862	51.09469514	15.86455094	45.83038034	5.369470792
72 h	120.101975	14.2080024	122.370323	14.9392463	106.980354	10.7369727	87.4417858	8.76934869	42.71719929	10.14240853		
Sirtinol		0 μ M		25 μ M		50 μ M		75 μ M		100 μ M		
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
0 h	100	6.67614289	100	6.67614289	100	6.67614289	100	6.67614289	100	6.67614289	100	6.67614289
24 h	67.6890959	26.2749359	85.5414592	14.3149852	80.1348964	8.14646343	75.6651143	6.46601896	48.49847439	10.6302471	45.59414127	5.347373435
48 h	109.837535	37.4734465	109.951287	15.2781245	109.951287	15.2781245	100.369359	14.6917158	82.11551844	13.77101378	45.83038034	5.369470792
72 h	120.101975	14.2080024	117.766715	14.6757299	110.031583	9.38722483	102.724694	8.80234801	87.14736898	18.2221981		
KG1A												
Salermide		0 μ M		25 μ M		50 μ M		75 μ M		100 μ M		
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
0 h	100	26.0404125	100	26.0404125	100	26.0404125	100	26.0404125	100	26.0404125	100	26.0404125
24 h	80.2372182	15.3765993	78.9166384	31.2527342	82.5705353	22.5271088	69.04735	23.2189206	34.12815007	22.29596653	45.59414127	5.347373435
48 h	137.488983	39.3211256	154.631408	108.027344	88.0325461	43.5740601	118.808152	78.814534	33.2994312	17.95326948	45.83038034	5.369470792
72 h	125.558393	10.2120736	126.643312	37.1234088	120.314913	39.0219052	52.2092892	19.8385824	11.18770483	5.627848652		
Sirtinol		0 μ M		25 μ M		50 μ M		75 μ M		100 μ M		
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
0 h	100	26.0404125	100	26.0404125	100	26.0404125	100	26.0404125	100	26.0404125	100	26.0404125
24 h	80.2372182	15.3765993	89.4263005	33.3505349	88.0325461	25.8687357	73.793649	24.2459397	64.33872001	27.86004844	45.59414127	5.347373435
48 h	137.488983	39.3211256	113.007119	37.7141096	132.293668	117.310343	97.2614608	64.9321028	62.30459186	19.50028003	45.83038034	5.369470792
72 h	125.558393	10.2120736	132.21833	36.9163552	132.105323	38.4753006	93.9465853	36.6407375	51.34290127	14.60955243		
RAJI												
Salermide		0 μ M		25 μ M		50 μ M		75 μ M		100 μ M		
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
0 h	100	9.35901701	100	9.35901701	100	9.35901701	100	9.35901701	100	9.35901701	100	9.35901701
24 h	117.889276	22.5816177	119.431142	15.9581835	107.894355	20.7802134	80.7575098	16.1583469	62.25511537	6.608215374	45.59414127	5.347373435
48 h	160.698737	34.3636333	194.311421	33.339233	157.088957	23.4370624	77.5649398	11.5818732	60.73138877	11.67289735	45.83038034	5.369470792
72 h	214.246844	36.837205	260.04934	29.803112	178.783921	18.307119	77.6374982	16.8471143	46.14714845	6.10066801		
Sirtinol		0 μ M		25 μ M		50 μ M		75 μ M		100 μ M		
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
0 h	100	9.35901701	100	9.35901701	100	9.35901701	100	9.35901701	100	9.35901701	100	9.35901701
24 h	117.889276	22.5816177	138.804237	20.3058091	154.694529	46.2646822	138.441445	36.5411437	123.8572051	26.41772129	45.59414127	5.347373435
48 h	160.698737	34.3636333	181.831374	24.5873877	162.748513	20.6093112	151.066609	19.0589654	101.0013061	12.83195769	45.83038034	5.369470792
72 h	214.246844	36.837205	235.016688	35.6661112	181.468582	21.2787411	147.148455	23.2423977	107.8217965	13.56250817		
MDA-MB-231												
Salermide		0 μ M		25 μ M		50 μ M		75 μ M		100 μ M		
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
0 h	100	5.53723841	100	5.53723841	100	5.53723841	100	5.53723841	100	5.53723841	100	5.53723841
24 h	120.48246	11.728047	110.718388	10.3736495	98.3476186	9.40972347	76.5220465	7.90756169	71.7504639	8.294269071	45.59414127	5.347373435
48 h	172.262967	21.189806	141.733675	12.5842472	108.155872	14.9314613	93.1342229	14.7585267	74.04789255	12.95204415	45.83038034	5.369470792
72 h	210.391446	15.800232	216.665194	26.4807298	161.791994	13.0105062	103.561014	9.36325516	92.86913493	10.8778824		
Sirtinol		0 μ M		25 μ M		50 μ M		75 μ M		100 μ M		
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
0 h	100	5.53723841	100	5.53723841	100	5.53723841	100	5.53723841	100	5.53723841	100	5.53723841
24 h	120.48246	11.728047	105.593355	11.2902907	109.658037	7.96621906	86.8604754	6.71355485	72.54572767	7.339282542	45.59414127	5.347373435
48 h	172.262967	21.189806	156.048423	10.9182203	155.253159	19.333326	90.8367942	8.64562223	76.25695856	21.23837342	45.83038034	5.369470792
72 h	210.391446	15.800232	211.716886	19.8220283	181.05505	33.1964692	103.73774	13.0542974	81.20526641	9.459796991		
SW480												
Salermide		0 μ M		25 μ M		50 μ M		75 μ M		100 μ M		
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
0 h	100	11.7303389	100	11.7303389	100	11.7303389	100	11.7303389	100	11.7303389	100	11.7303389
24 h	182.064981	11.728047	165.616562	39.7347346	103.249035	17.775328	86.0021486	13.7852847	62.07717546	9.739411216	45.59414127	5.347373435
48 h	215.019889	21.189806	93.1447984	26.3124255	71.0780755	13.4534936	61.2061206	8.31317287	48.66293081	10.67970262	45.83038034	5.369470792
72 h	339.319416	15.800232	264.21997	61.4849652	84.0277576	13.3942674	71.8910601	12.7086343	60.45120641	14.06610002		
Sirtinol		0 μ M		25 μ M		50 μ M		75 μ M		100 μ M		
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
0 h	100	11.7303389	100	11.7303389	100	11.7303389	100	11.7303389	100	11.7303389	100	11.7303389
24 h	182.064981	11.728047	166.487617	30.7932585	126.709445	39.4798539	64.5741994	11.8574342	72.58790395	12.71879374	45.59414127	5.347373435
48 h	215.019889	21.189806	206.323858	26.4492916	136.174908	32.575392	92.0995325	16.2274923	69.68438779	10.11414611	45.83038034	5.369470792
72 h	339.319416	15.800232	285.415638	63.1034298	189.657675	48.0544389	64.864551	11.3547051	55.57329927	8.067357311		
MRC5												
Salermide		0 μ M		25 μ M		50 μ M		75 μ M		100 μ M		
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
0 h	100	61.607163	100	61.607163	100	61.607163	100	61.607163	100	61.607163	100	61.607163
24 h	137.194369	30.6083991	126.69795	25								

5- Efectos de Salermide sobre el ciclo celular de MOLT4

Los inhibidores de las HDACs de clase I, II y IV inducen muerte de las líneas tumorales y presentan todas las características bioquímicas y morfológicas propias de un proceso apoptótico (Mariadason 2008). Como anteriormente se había observado que ciertos inhibidores de Sirtuinas, por ejemplo, el Sirtinol, producía un efecto de arresto del ciclo celular sobre ciertas líneas tumorales (OTA *et al.* 2006), estudiamos posibles cambios en las distintas etapas del ciclo celular en las células antes y después del tratamiento con Salermide.

Analizamos el ciclo celular de MOLT4 mediante citometría celular, marcando las células con IP. Utilizamos para el ensayo MOLT4 ya que era la línea sobre la que habíamos observado un mayor efecto en la viabilidad celular mediado por Salermide. Detectamos una proporción muy elevada de células muertas y/o apoptóticas (fase Sub-G₀) tras el tratamiento con Salermide en la línea tumoral MOLT4 (Figura 12), por lo que decidimos hacer un estudio más detallado de apoptosis por citometría de flujo usando un marcaje combinado de Anexina V y IP.

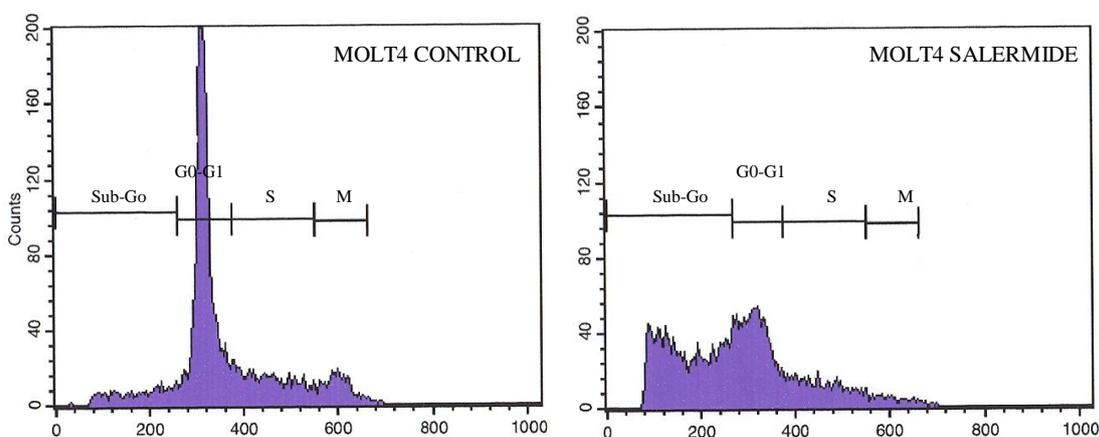


Figura 12: Ciclo celular en MOLT4 tras el tratamiento con Salermide a una dosis de 100 μM durante 24 horas. Sub-G₀ contiene a células muertas por necrosis y apoptosis, G₀-G₁ muestra a las células latentes y en fase G1 del ciclo, S contiene a las células en interfase celular y M a las células en proceso mitótico.

El ensayo de apoptosis celular lo realizamos sobre las líneas celulares MOLT4, K562, MDA-MB-231, SW480 y MRC5 utilizando una concentración de

100 μ M de Salermide. El tratamiento con Salermide indujo una alta tasa de apoptosis en MOLT4 sin que produzca cambios evidentes en la línea no tumoral MRC5 (Figura 13). La línea tumoral en la que detectamos un menor número de células apoptóticas fue SW480 (Figura 13).

Además, mediante el ensayo de apoptosis utilizando concentraciones crecientes del inhibidor en la línea tumoral MOLT4 confirmamos que el efecto de Salermide dependía de la dosis empleada (hecho observado también con el ensayo de viabilidad celular) (Figura 14).

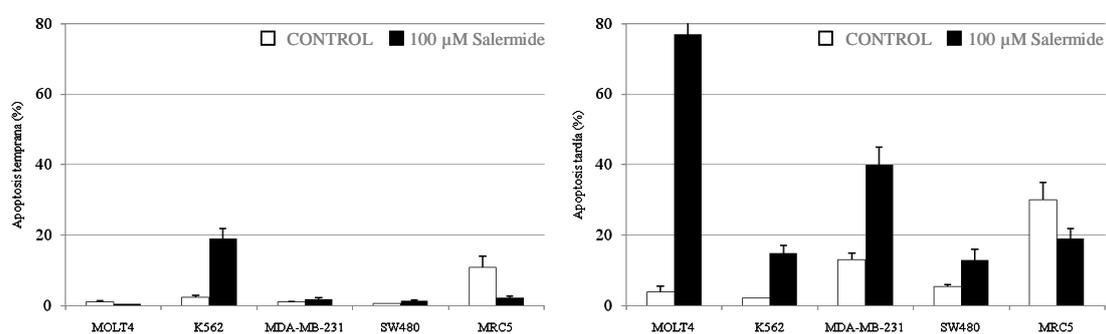


Figura 13: Porcentaje de diferentes tipos celulares en apoptosis temprana y tardía tras la incubación durante 24 horas de Salermide a una concentración de 100 μ M (barras en negro) o de DMSO (control negativo, barras en blanco). Salermide provoca una alto porcentaje en cultivo de células apoptóticas en fase tardía en todas las líneas celulares estudiadas, a excepción de la no tumorigénica, MRC5; en donde no se observan variaciones apreciables con respecto al control.

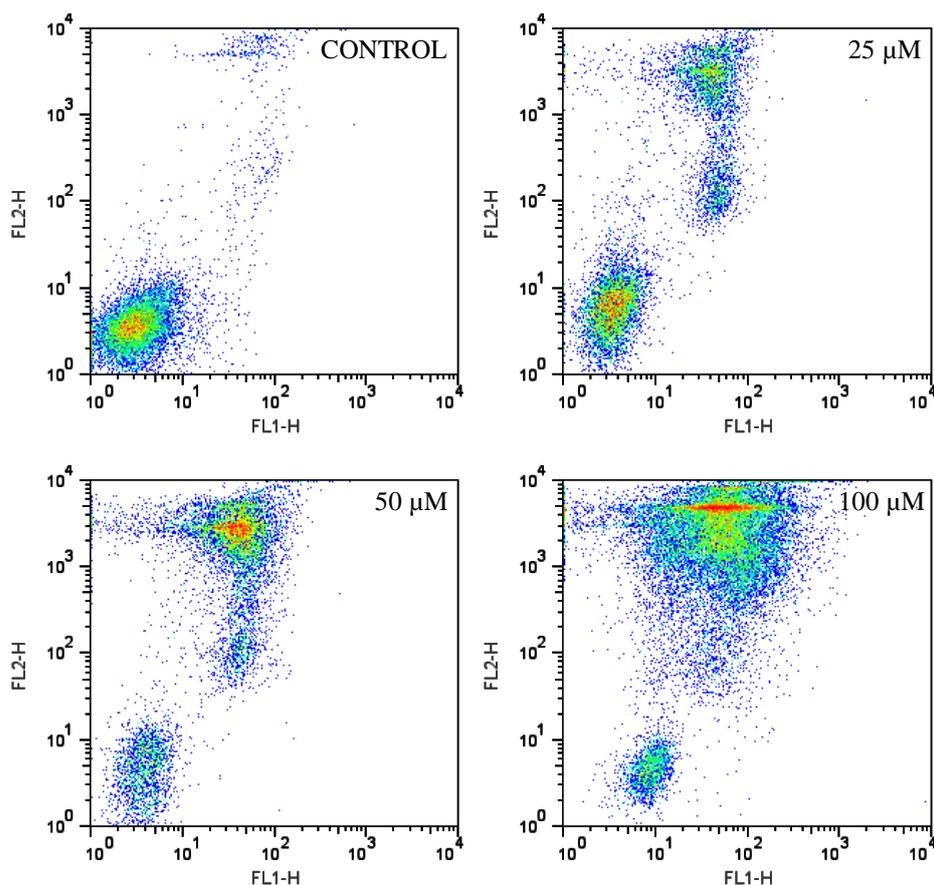


Figura 14: Apoptosis celular mediante el ensayo de Anexina V - IP en MOLT4 tras el tratamiento con Salermide a diferentes dosis (0, 25, 50 y 100 μM). FL1-H es el canal por el que se detecta la señal de Anexina V y FL2-H es el que detecta al IP. El efecto de Salermide sobre MOLT4 depende de la dosis utilizada.

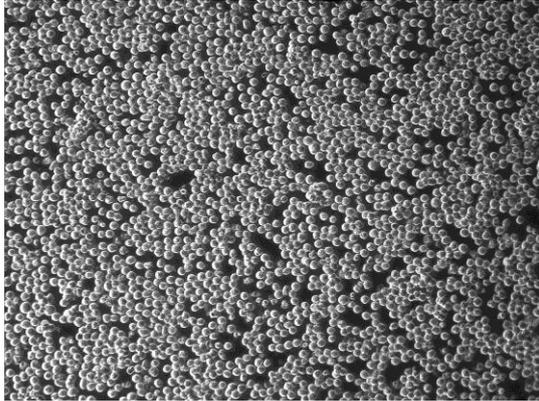
6- Efectos de Salermide sobre la morfología celular de líneas tumorales

Determinamos los efectos que Salermide inducía sobre la morfología celular mediante microscopía óptica con contraste de fases y tras 24 horas de incubación con el inhibidor a dosis de 25 μM y 100 μM .

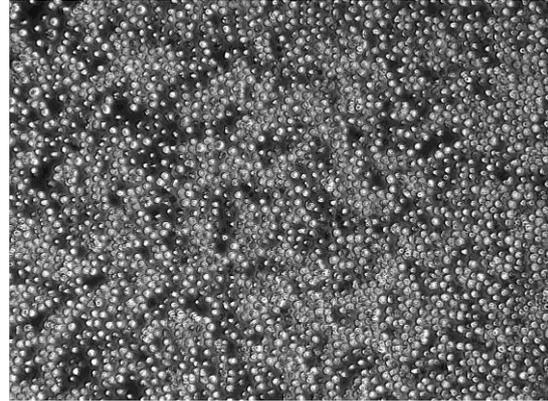
Observamos cambios drásticos en la morfología de la línea tumoral MOLT4 que correspondían con los que caracterizan a un proceso apoptótico. La membrana celular dejaba de exhibir su aspecto liso y ofrecía un perfil rugoso. El brillo observado en una célula viva dejaba de mostrarse y parte de la población celular tenía un tamaño menor que las células control (Figura 15). En cambio, estos efectos no fueron tan evidentes en las líneas tumorales de cáncer de colon y de mama, que apenas cambiaron su morfología (Figura 15).

Lo único que observamos en estas líneas tumorales fue un ligero descenso en el número celular. Todo ello corroboraba que el efecto apoptótico que produce Salermide era más potente en líneas de leucemias y/o linfomas que en otros tipos celulares.

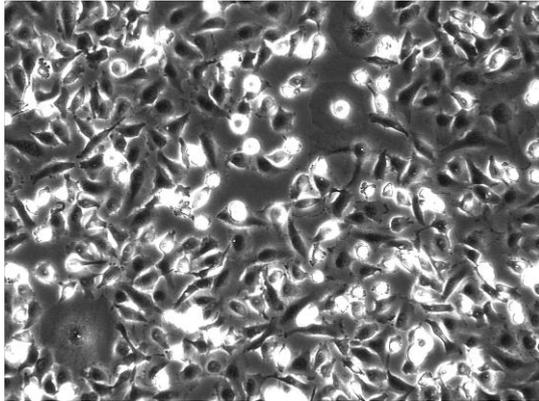
MOLT4 Control



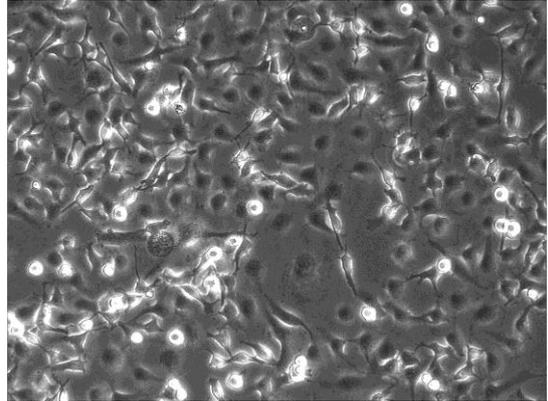
MOLT4 Salermide



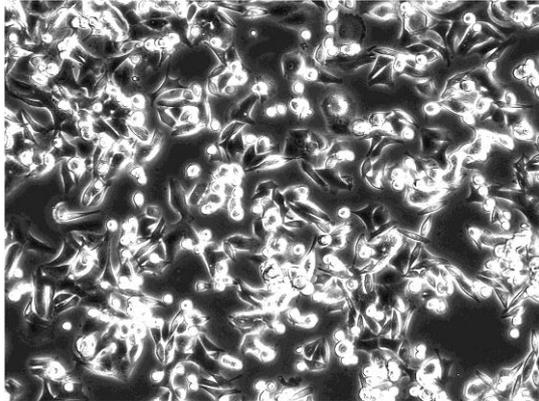
MDA-MB-231 Control



MDA-MB-231 Salermide



SW480 Control



SW480 Salermide

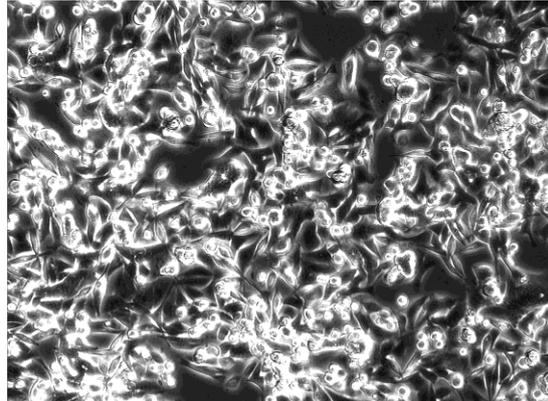


Figura 15: Imágenes obtenidas por microscopia de distintas líneas celulares tratadas o no con Salermide a una dosis de 25 μ M.

7- Ensayo de tolerabilidad de Salermide en ratones inmunodeprimidos

Una vez comprobado que el efecto apoptótico de Salermide era específico para líneas tumorales, comprobamos que este inhibidor no presentaba toxicidad ni efectos adversos *in vivo*. Para ello administramos Salermide vía intraperitoneal en dosis de 0.04 mg en un volumen de 200 µl del vehículo PBS + 10% DMSO a un grupo de 10 ratones *nude* durante 5 días. Evaluamos la salud de los ratones por distintos parámetros durante los 34 días que duró el ensayo. Durante este tiempo no observamos ningún efecto adverso que Salermide pudiese provocar en la salud de estos ratones, tales como cambios significativos en la alimentación, en el comportamiento o en el peso. Dados estos resultados concluimos que la administración intraperitoneal de Salermide en este modelo animal no producía una toxicidad aparente.

8- Estudio de las vías apoptóticas que median en el efecto de Salermide

Una vez determinada que la actividad antitumoral de Salermide se debía a la promoción de un proceso apoptótico, decidimos estudiar el mecanismo molecular implicado en este proceso. La muerte celular por apoptosis es un proceso esencial en la regulación del sistema inmune, en la homeostasis tisular y en el desarrollo embrionario. Todos los procesos apoptóticos presentan características similares, condensación de la cromatina, fragmentación del DNA y cambios morfológicos en la membrana plasmática (HENGARTNER 2000; STRASSER *et al.* 2000). La mitocondria es el orgánulo clave en el desarrollo de un proceso apoptótico. La localización de Bax en la mitocondria desencadena la liberación del citocromo c al citoplasma, lo que produce la activación de la caspasa 3 y el desencadenamiento de una de las principales rutas de apoptosis (GREEN and KROEMER 2004; NEWMAYER and FERGUSON-MILLER 2003). Con la finalidad de investigar si la inducción de apoptosis producida por Salermide estaba mediada por la vía mitocondrial (íntrínseca) de apoptosis, decidimos analizar los niveles citosólicos y mitocondriales de citocromo c y la caspasa 3 activada, dos mediadores bien identificados de esta vía apoptótica.

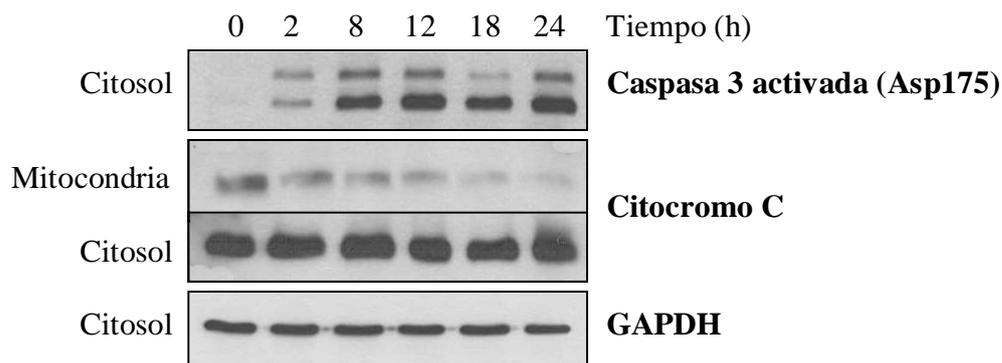


Figura 16: Western Blotting de Citocromo C y Caspasa 3, proteínas implicadas en el proceso apoptótico. Como control de carga se utiliza GAPDH.

La incubación de MOLT4 con Salermide a una concentración de 100 μM produjo un incremento de los niveles citosólicos de caspasa 3 activa y un descenso de los niveles de citocromo c mitocondrial (Figura 16) tras 2 horas de tratamiento y durante 24 h de incubación, cuando la mayoría de las células estaban ya muertas. Sin embargo, la activación por proteólisis de la caspasa 3 nos impedía excluir la implicación de la ruta extrínseca (mediada por receptores de muerte) de apoptosis. Por lo tanto, nuestros datos evidenciaron que el fenómeno apoptótico provocado por Salermide podría estar mediado tanto por las vías intrínsecas como por las vías extrínsecas de apoptosis.

9- Estudio de inducción de apoptosis mediada por inhibición de Sirt2

Después de demostrar por varias vías que la actividad antitumoral de Salermide se debía a la inducción de apoptosis, decidimos investigar los mecanismos moleculares implicados en este proceso. Debíamos especificar si esta acción apoptótica estaba desencadenada por el efecto que ejercía Salermide sobre la inhibición de Sirt1 y/o de Sirt2.

Como en los estudios previos realizados sobre el panel de inhibidores de Sirtuinas, habíamos observado que Salermide tenía un efecto más potente en la inhibición *in vitro* de Sirt2 que la producida sobre Sirt1, decidimos empezar el estudio del posible papel que Salermide ejercía en la apoptosis celular mediada por la inhibición de Sirt2.

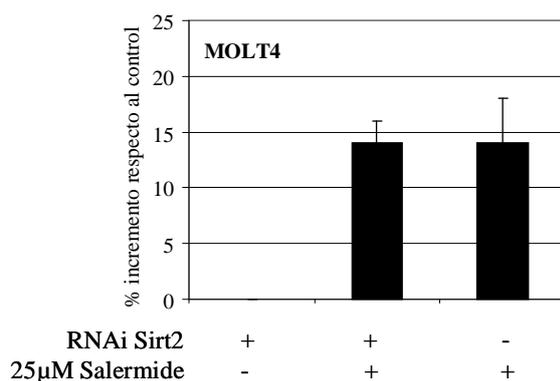


Figura 17: Porcentaje de células MOLT4 apoptóticas tras la inhibición de Sirt2 por RNA de interferencia, tras la incubación con Salermide o tras el tratamiento combinado. Los resultados se expresan como incremento de células en apoptosis tras el tratamiento con respecto al control de células sin tratar.

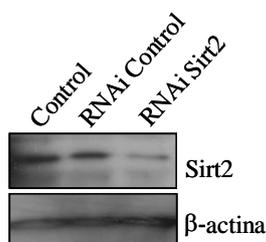


Figura 18: Western blotting de Sirt2 realizado sobre los extractos de proteínas totales de MOLT4 tras la inhibición por RNA de interferencia de la expresión de Sirt2 (RNAi Sirt2), tras la incorporación de un oligo de RNA inespecífico (RNAi control) o sin tratamiento (control). Se utiliza como control de carga β-actina.

Para ello, inhibimos la expresión de Sirt2 mediante el uso de RNA interferente en la línea donde Salermide ejercía un mayor efecto apoptótico, MOLT4 (Figura 18). Realizamos varios ensayos, uno combinado con Salermide a una dosis de 25 µM (concentración que se correspondía con el IC50) e inhibiendo la expresión de Sirt2 mediante la interferencia del RNA y sus respectivos ensayos de tratamiento con el inhibidor y con la interferencia, por separado.

La inhibición de la expresión de Sirt2 mediante el RNA de interferencia no desencadenó un proceso apoptótico en MOLT4. En cambio, tras el tratamiento con Salermide, las células presentaron un porcentaje de apoptosis similar al observado tras el tratamiento combinado, de aproximadamente un 15% con respecto al control de células sin tratar (Figura 17).

Por lo tanto, aunque en un principio, tras el ensayo de inhibición *in vitro*, parecía que Salermide podría producir apoptosis en las células tumorales por

un mecanismo mediado por la inhibición de Sirt2, estos resultados indicaron que *in vivo*, Salermide no actuaba a través de esta sirtuina.

Decidimos estudiar el efecto que ejercía Salermide sobre dos de las dianas principales de Sirt2, tubulina y lisina 16 de la histona H4 (K16H4) con el propósito de descartar la implicación de la inhibición de Sirt2 en la apoptosis celular producida por Salermide. Si Salermide actuara inhibiendo a Sirt2 podríamos suponer que los niveles de acetilación de tubulina (NORTH *et al.* 2003) y de K16H4 (VAQUERO *et al.* 2006) se verían incrementados.

Analizamos los niveles de tubulina acetilada mediante WB, usando un anticuerpo específico para la forma acetilada de la tubulina, en extractos proteicos de células tratadas con Salermide a diferentes dosis (25 y 100 μ M) y durante 24 horas. Tras el tratamiento con el inhibidor detectamos un incremento muy débil de la acetilación de la tubulina en MOLT4 y MDA-MB-231 (Figura 19). Sin embargo, este ligero incremento en la acetilación de tubulina no lo detectamos en SW480, que presentaba niveles de apoptosis similares a MDA-MB-231. Por lo tanto, aún cuando Salermide podía inducir un ligero efecto en la acetilación de la tubulina mediado por la inhibición de Sirt2, su capacidad inductora de apoptosis en células cancerosas no parecía estar mediada por esta vía molecular.

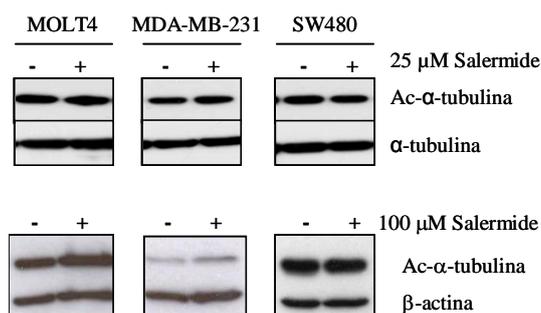


Figura 19: Western blotting de α -tubulina acetilada en líneas tumorales tras el tratamiento con Salermide a dosis de 25 μ M y 50 μ M.

Analizamos los niveles de acetilación de la K16H4 mediante WB utilizando un anticuerpo específico para esta modificación de histona y por espectrometría de masas en tandem (VILLAR-GAREA *et al.* 2008). Además cuantificamos los niveles de acetilación global de la histona H4 mediante

electroforesis capilar de alta resolución o HPCE (FRAGA *et al.* 2005b) y mediante espectrometría de masas top-down (PARKS *et al.* 2007).

Comprobamos mediante HPCE y espectrometría de masas que Salermide no producía un incremento de los niveles de acetilación global de la histona H4 en las líneas tumorales estudiadas (Figuras 20 y 21). De las cinco líneas tumorales analizadas sólo detectamos un ligero aumento de los niveles de acetilación global de la histona H4 en MDA-MB-231 tras el tratamiento con el inhibidor (Figura 21). Además comprobamos mediante WB que esta era la única línea en la que se veía un pequeño aumento de la acetilación de K16H4 (Figura 23). Confirmamos la pérdida de hiperacetilación K16H4 por espectrometría de masas en células RAJI en las cuales observamos un descenso en la acetilación de la histona H4 en el péptido 4-17 en el espectro MALDI-TOF tras 24 horas de tratamiento con Salermide (Figura 22). Por lo tanto, todos estos resultados indicaron que el efecto apoptótico y antitumoral de Salermide no parecía estar mediado ni directa ni indirectamente por la inhibición de Sirt2. Sin embargo, esto no quería decir que Salermide no pudiera inhibir la actividad de Sirt2 *in vivo*, ya que podría ocurrir que Salermide actuara rápidamente sobre otras dianas para la inducción de apoptosis en las células cancerosas, y que este tiempo no fuera suficiente para observar los efectos biológicos que Salermide pudiera ejercer mediante la inhibición de Sirt2.

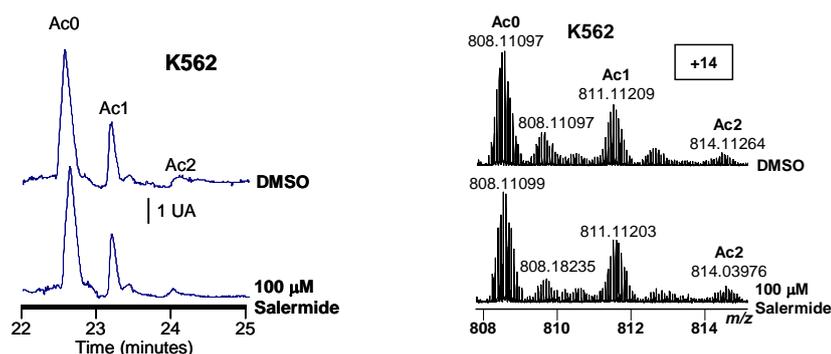


Figura 20: El panel de la izquierda muestra los electroferogramas obtenidos mediante HPCE de las diferentes isoformas acetiladas de la histona H4 en la línea celular K562 control (DMSO) y tras el tratamiento con 100 μM de Salermide. El panel de la derecha muestra el espectro obtenido de la espectrometría de masas de la histona H4 en la línea celular K562 control (DMSO) y tras el tratamiento con 100 μM de Salermide. El ratio m/z (carga +14) para cada pico

aparece en la parte superior del mismo. Ac1, Ac2 y Ac3 indican las isoformas mono-, di- y tri-acetiladas de la histona H4 respectivamente.

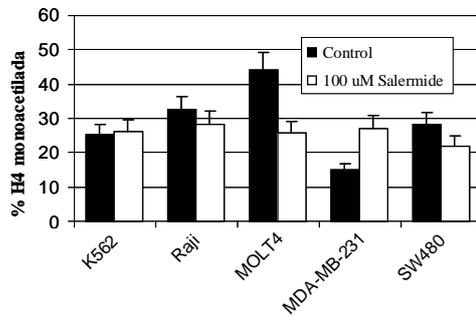


Figura 21: Cuantificación relativa de los niveles de histona H4 monoacetilada obtenidos mediante el HPCE en distintas líneas tumorales.

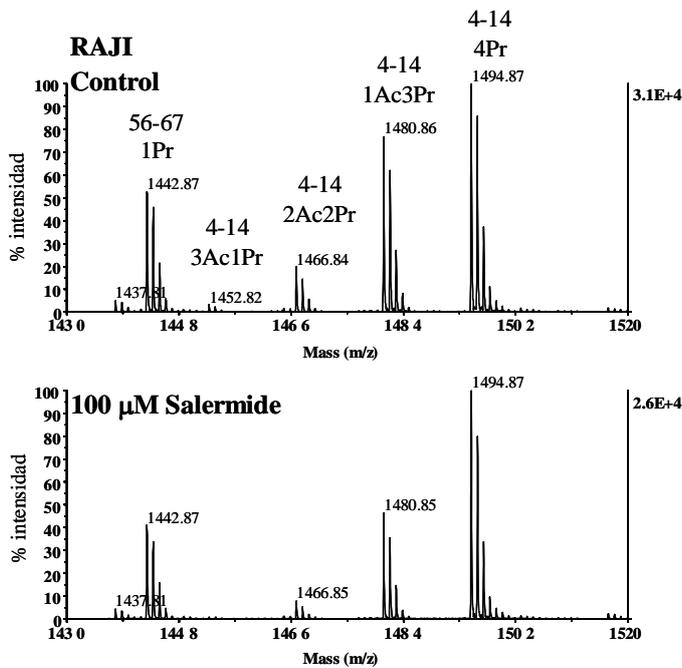


Figura 22: Análisis de la histona H4 por espectrometría de masas de las células RAJI control y tras el tratamiento con Salermide. Se observa en la figura el espectro del péptido 4-14 de la histona H4. El espectro con mayor ratio m/z es el que contiene los cuatro grupos propionilo que corresponde a la forma no modificada *in vivo*.

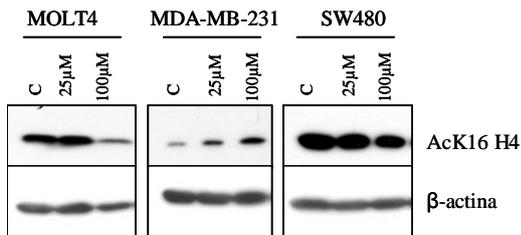


Figura 23: Western blot de los niveles proteicos de K16H4 acetilada (AcK16H4) en diferentes líneas tumorales tras el tratamiento (+) o no (-) con Salermide.

10- Estudio de inducción de apoptosis mediada por inhibición de Sirt1

Una vez confirmado el hecho de que Salermide era capaz de inducir un proceso apoptótico antitumoral que no estaba mediado por la inhibición de Sirt2, nos propusimos estudiar la mediación de la inhibición de Sirt1. Como ya se había descrito anteriormente, la inhibición de la expresión de Sirt1 podía producir un aumento en la apoptosis en varias líneas celulares tumorales (CHEN *et al.* 2005; FORD *et al.* 2005; PRUITT *et al.* 2006; STUNKEL *et al.* 2007; SUN *et al.* 2007).

Para estudiar la implicación de Sirt1 en el proceso apoptótico provocado por el tratamiento con Salermide, inhibimos la expresión de Sirt1 mediante RNA de interferencia en la línea celular MOLT4 y después tratamos con Salermide. Observamos que la inhibición de Sirt1 mediante interferencia del RNA producía apoptosis en el 10% de las células en cultivo y que tras el tratamiento con Salermide a una dosis final de 25 μ M ese porcentaje de células apoptóticas aumentaba hasta aproximadamente un 16% (Figura 24). Esta ligera diferencia en el porcentaje podría explicarse por el hecho de que la eficiencia de interferencia de Sirt1 no fue del 100%, ya que aproximadamente sólo un 70% de las células mostraron una inhibición de la expresión de Sirt1. Por lo tanto, teniendo en cuenta esta consideración, podríamos decir que el porcentaje de células apoptóticas era prácticamente el mismo tras la interferencia de Sirt1 que tras el tratamiento con Salermide. Además, el tratamiento combinado de interferencia de RNA y Salermide indujo casi el mismo porcentaje de apoptosis que cuando tratamos sólo con Salermide, lo cual también apoyaba la idea de que el mecanismo de acción de Salermide *in vivo* podría estar mediado por la inhibición de Sirt1.

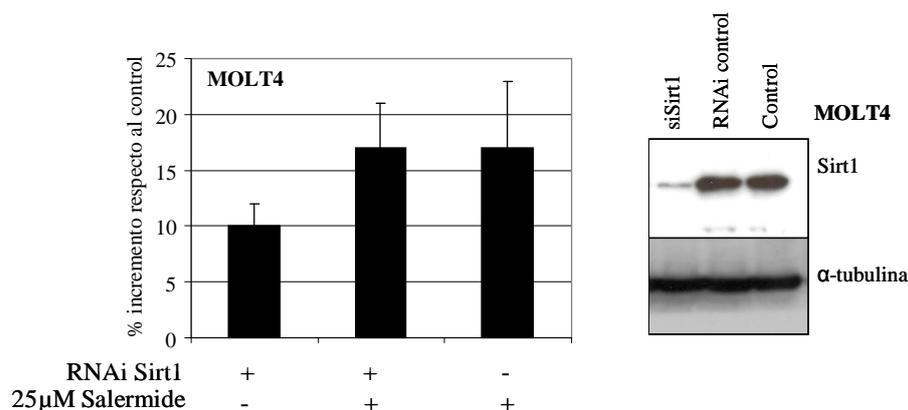


Figura 24: Inhibición de Sirt1 en MOLT4 por RNA interferente. En la parte izquierda se observa un gráfico que muestra el incremento de células apoptóticas MOLT4 tras la interferencia de Sirt1 (RNAi Sirt1), tras el tratamiento con Salermide o con una combinación de ambos factores. En la parte derecha se representa la reducción de la expresión proteica de Sirt1 tras el tratamiento con RNA interferente mediante WB.

Con la finalidad de detallar la implicación de Sirt1 en el fenómeno de muerte celular inducida por Salermide, decidimos estudiar el nivel de acetilación de una de las principales dianas de Sirt1 que median en la apoptosis celular, p53 (VAZIRI *et al.* 2001). Sirt1 es capaz de desacetilar p53 e inhibir la respuesta celular al estrés mediada por esta proteína (LUO *et al.* 2001).

Nuestra hipótesis era que Salermide inhibía a Sirt1, se producía un aumento en la acetilación de p53, con lo cual estaba activa y podía inducir la apoptosis de las líneas tumorales. Para comprobar esta hipótesis, determinamos el nivel de acetilación de p53 en MOLT4, MDA-MB-231 y SW480 antes y después del tratamiento con Salermide mediante WB usando un anticuerpo específico para su forma acetilada en la posición lisina 382.

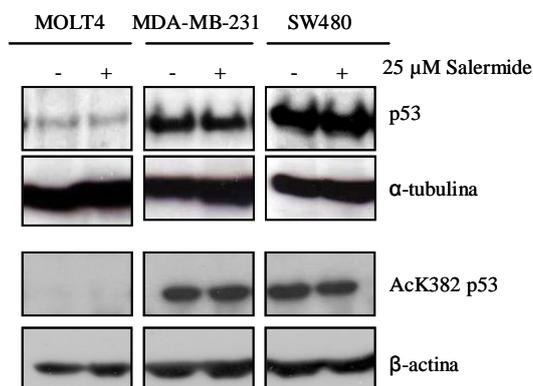


Figura 25: WB de los niveles de proteínas de p53 y de p53 acetilada en el residuo de lisina 382 (AcK382p53) en varias líneas tumorales tras el tratamiento (+) o no (-) con Salermide. α -tubulina y β -actina son utilizados como controles de carga de p53 y AcK382p53 respectivamente.

Lo primero que observamos fue que, como ya se había descrito anteriormente, MOLT4 tenía niveles muy bajos de expresión de la proteína p53 (RODRIGUES *et al.* 1990) (Figura 25). Esta característica, unida al hecho de que Salermide inducía una alta tasa de apoptosis en esta línea celular, descartaba la posibilidad de que p53 ejerciera un papel fundamental en este proceso. Además, mediante el análisis por WB, no detectamos diferencias apreciables en los niveles de acetilación de p53 en respuesta a dosis de 25 μ M de Salermide en las otras líneas estudiadas, MDA-MB-231 y SW480 (Figura 25).

Para examinar en profundidad la implicación de Sirt1 en la acetilación de p53, inhibimos la expresión de Sirt1 mediante RNA de interferencia y estudiamos el efecto que causaba en la acetilación de p53 en MOLT4, MDA-MB-231 y SW480. Sólo detectamos un ligero aumento en la acetilación de p53 tras la interferencia de Sirt1 en las células MDA-MB-231 (Figura 26). Por lo tanto, se podría decir que el efecto ejercido por Sirt1 sobre la acetilación de p53 era variable, como ya lo habían indicado anteriormente otros autores; afectando positivamente (HELTWEG *et al.* 2006; LAIN *et al.* 2008) o negativamente (OTA *et al.* 2006) y dependiendo de la línea celular.

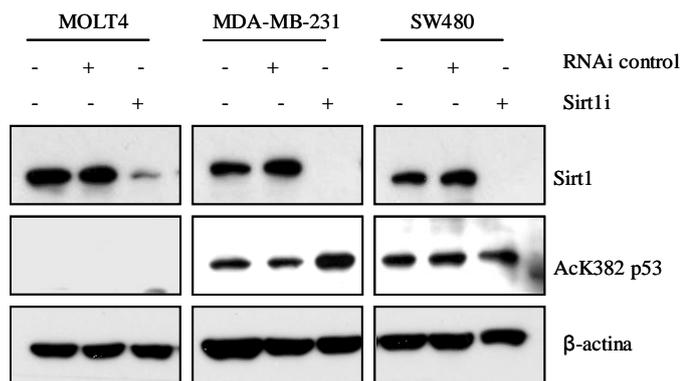


Figura 26: WB de los niveles de proteínas de Sirt1 y de p53 acetilada en el residuo de lisina 382 (AcK382p53) en varias líneas tumorales tras la interferencia con un oligo inespecífico (RNAi control) o con un oligo específico de Sirt1 (Sirt1i). β-actina es utilizada como control de carga.

Por lo tanto, nuestros resultados confirmaron que Salermide podía inducir apoptosis sin incrementar la acetilación de p53 (en SW480) y aún cuando p53 no se expresara (en MOLT4). Estos resultados concordaban con lo anteriormente observado en la línea celular MCF7, en la que la inhibición de Sirt1 no inducía un incremento en la acetilación de p53 (OTA *et al.* 2006), y en la línea HCT116 deficiente de p53, en la que la inhibición de Sirt1 producía un aumento en la apoptosis celular (FORD *et al.* 2005). Todas estas observaciones indican que p53 puede ser dispensable en la promoción de la apoptosis inducida por la inhibición de Sirt1 en las células cancerosas.

Ya que Salermide inducía una apoptosis masiva en menos de 24 horas de tratamiento en las células tumorales, y como previamente ya se había descrito que algunos de los efectos protumorigénicos de Sirt1 estaban mediados por el reclutamiento de esta sirtuina a la región promotora de los genes supresores tumorales reprimiéndolos de forma aberrante (PRUITT *et al.* 2006), se decidió comprobar la siguiente hipótesis: Salermide inhibe la acción de Sirt1, lo que conlleva la activación de genes proapoptóticos reprimidos por Sirt1 específicamente en cáncer y provoca el desencadenamiento de un proceso apoptótico exclusivo de las células tumorales. La inhibición de Sirt1 producida por Salermide podría traducirse en una hiperacetilación y activación de los genes proapoptóticos.

Para comprobar esta hipótesis, lo primero que debíamos comprobar era el estado de expresión génica de los genes implicados en el proceso apoptótico antes y después del tratamiento con Salermide, y además, determinar que en el caso de una sobreexpresión de genes proapoptóticos tras el tratamiento con el inhibidor, ésta fuera específica en células tumorales, pero no en células normales. Para ello utilizamos un array que contenía aproximadamente 90 sondas Taqman de genes implicados en el proceso apoptótico y testamos el nivel de expresión de todos estos genes tanto en la línea tumoral MOLT4 como en la no tumoral MRC5, antes y después del tratamiento con Salermide a una concentración final de 25 μM .

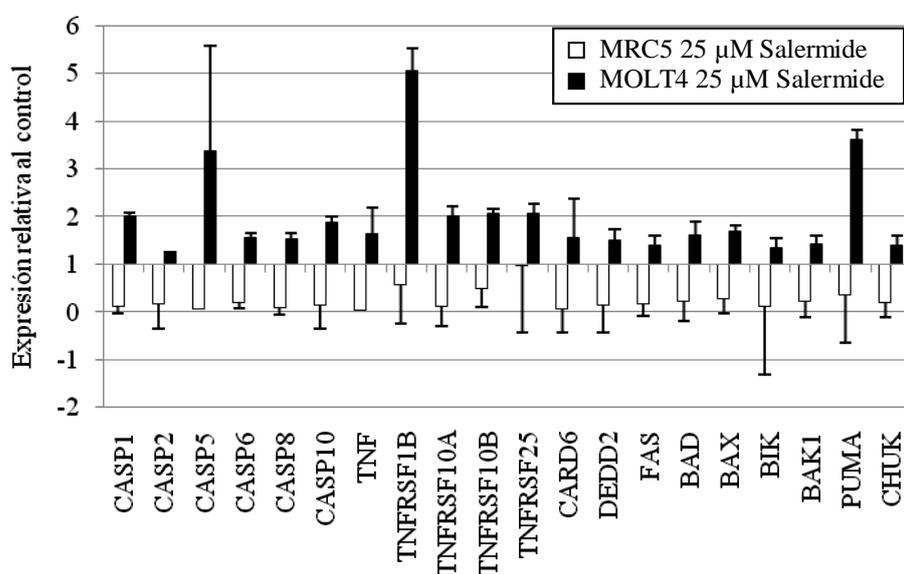


Figura 27: Expresión relativa de genes proapoptóticos tras el tratamiento de MRC5 (barras blancas) y MOLT4 (barras negras) con Salermide con respecto a las células tratadas con el vehículo (DMSO).

Nuestros resultados confirmaban lo esperado, encontramos que 20 de los 37 genes proapoptóticos que contenía el array (aproximadamente un 54%) estaban sobre-expresados (en más de un 20%) en MOLT4 después del tratamiento con Salermide, pero que, curiosamente, ninguno de estos genes mostraba esa sobreexpresión en la línea no tumorigénica MRC5 después del tratamiento (Figura 27).

Una vez confirmado el hecho de que la apoptosis producida por Salermide en las líneas tumorales estaba correlacionada con una sobre-expresión de los genes que promovían un proceso apoptótico, decidimos comprobar su relación con la inhibición de Sirt1.

Analizamos la expresión de genes apoptóticos con el array de expresión en la línea tumoral MOLT4, a la cual, mediante un ensayo de interferencia de RNA, le habíamos inhibido la expresión de Sirt1. Observamos que 18 de los 37 genes proapoptóticos (aproximadamente un 49%) estaban sobre-expresados (en más de un 20%) en MOLT4 después de la inhibición de Sirt1 (Tabla 3 y Figura 28). Además, es muy interesante resaltar que todos estos genes coincidieron con los sobre-expresados en esta línea celular tras el tratamiento con Salermide. Además, el hecho de que tras el tratamiento con Salermide se reactiven más genes proapoptóticos que tras la interferencia de Sirt1, podría explicarse por la tasa de éxito en el proceso de inhibición de Sirt1 mediada por RNA de interferencia, que no es del 100%, sino del 70%.

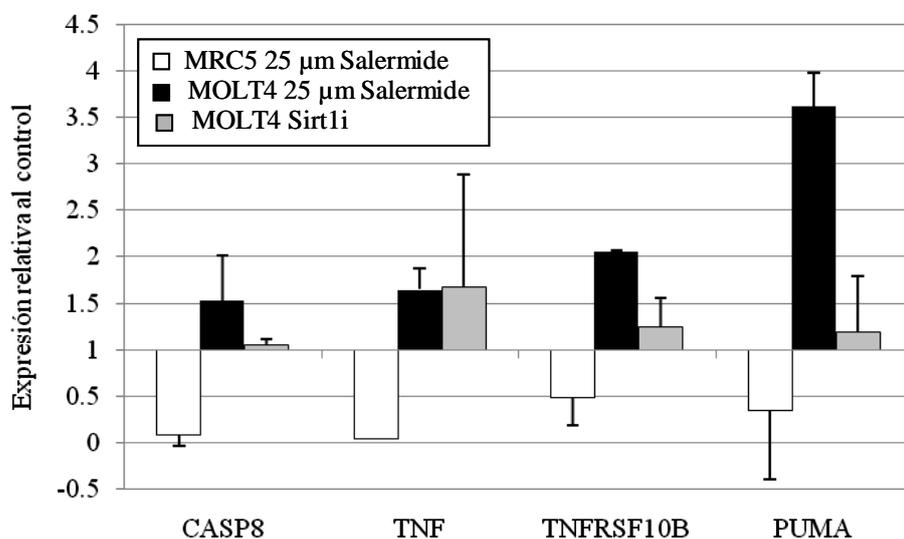


Figura 28: Expresión relativa de genes proapoptóticos seleccionados en MRC5 tratadas con Salermide (barras blancas), MOLT4 tratada con Salermide (barras negras) y MOLT4 con baja expresión de Sirt1 mediante RNA de interferencia (barras grises).

Gen	Nombre	Categoría	Localización	Exon estudiado	NCBI referencia	Celera ID	
I	CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase	11q23	7	NM_033292.2	hCT2334637.0	
	CASP2	caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase	7q34-q35	10	NM_032982.2	hCT2288212.0	
	CASP8	caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	2q33-q34	4	NM_033355.2	hCT2303187.0	
	TNFRSF1B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B	1p36.3-p36.2	8	NM_001066.2	hCT14657.3	
	TNFRSF10A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	8p21	2	NM_003844.2	hCT22769.3	
	CARD6	caspase recruitment domain family, member 6	5p13.1	1	NM_032587.2	hCT28573.2	
	DEDD2	death effector domain containing 2	19q13.2	3	NM_133328.2	hCT1966694.1	
	FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	10q24.1	2	NM_152871.1	hCT14084.3	
	BAD	BCL2-antagonist of cell death	11q13.1	1	NM_032989.1	hCT12460.2	
	BAX	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)	19q13.3-q13.4	2	NM_138761.2	hCT1953544.1	
	BIK	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)	22q13.31	2	NM_001197.3	hCT1772353.2	
	CASP3	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	4q34	6	NM_032991.2	hCT1958323.1	
	CASP6	caspase 6, apoptosis-related cysteine peptidase	4q25	3	NM_032992.2	hCT1965641.1	
	CASP10	caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase	2q33-q34	8	NM_032974.2	hCT8031.2	
	TNF	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	6p21.3	3	NM_000594.2	hCT35001.2	
	TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	3q26	3	NM_003810.2	hCT11324.3	
	TNFSF10B	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10b	8p22-q21	2	NM_147187.1	hCT1969297.1	
	BBC3/PUMA	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	19q13.3-q13.4	2	NM_014417.2	hCT2277486.0	
	DIABLO	BCL2 binding component 3 diablo homolog (Drosophila)	12q24.31	5	NM_138930.2	hCT1954757.1	
	II	CASP2	caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase	7q34-q35	10	NM_032982.2	hCT2288212.0
		CASP5	caspase 5, apoptosis-related cysteine peptidase	11q22.2-q22.3	2	NM_004347.1	hCT2334643.0
CASP7		caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase	10q25	6	NM_033338.4	hCT1957988.1	
CASP9		caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase	1p36.3-p36.1	1	NM_032996.1	hCT1966726.1	
CARD4		caspase recruitment domain family, member 4	7p15-p14	5	NM_006092.1	hCT2301899.0	
CASP14		caspase 14, apoptosis-related cysteine peptidase	19p13.1	3	NM_012114.1	hCT29832.3	
TNFRSF21		caspase 14, apoptosis-related cysteine peptidase	6p21.1-12.2	2	NM_014452.3	hCT2284304.0	
CARD15		tumor necrosis factor receptor superfamily, member 15	16q21	6	NM_022162.1	hCT1821593.1	
APAF1		apoptotic peptidase activating factor	1q23	5	NM_181861.1	hCT27949.2	
FASLG		Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	1q23	2	NM_000639.1	hCT28877.2	
BOK		BCL2-related ovarian killer	2q37.3	3	NM_032515.3	hCT1965484.1	
FADD		Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	11q13.3	1	NM_003824.2	hCT2309668.0	
DEDD		death effector domain containing	1q23.3	4	NM_032998.1	hCT2275491.0	
TNFRSF1A		tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	19p13.2	5	NM_001065.2	hCT15432.2	
BID		BH3 interacting domain death agonist	22q11.1	4	NM_197966.1	hCT12618.3	
CASP4		caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	11q22.2-q22.3	3	NM_033306.2	hCT31375.2	
CRADD		CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	12q21.33-q23.1	2	NM_003805.3	hCT31343.3	
CASP8AP2		CASP8 associated protein 2	6q15	8	NM_012115.2	hCT23591.2	

Tabla 3: Clase I indica a los genes proapoptóticos sobre-expresados en MOLT4 tras el tratamiento con Salermide (concentración de 25 µM) y en MOLT4 tras la inhibición de Sirt1 con siRNA. Clase II indica a los genes proapoptóticos sobre-expresados exclusivamente tras el tratamiento de MOLT4 con Salermide (concentración de 25 µM). Sobre-expresión indica un incremento en la expresión de, al menos, un 20% con respecto al control.

El alto grado de coincidencia entre los genes reactivados tras el tratamiento con Salermide y tras la inhibición de Sirt1 en MOLT4, sugería, de nuevo, que el mecanismo de acción de Salermide *in vivo* estaría específicamente mediado por la inhibición de Sirt1.

Terminamos de comprobar la hipótesis inicial mediante el análisis por ChiP (inmunoprecipitación de la cromatina) de ocupación de promotores por Sirt1 y AcK16H4 en MOLT4 antes y después del tratamiento con Salermide.

Analizamos la ocupación de los promotores de 4 de los genes reactivados tras el tratamiento con Salermide (CASP8, TNF, TNFRSF10B y PUMA) (Figura 28) por Sirt1 y AcK16 H4 en MOLT4. La línea de estudio fue MOLT4, antes y después del tratamiento, y en ella se estudió Utilizamos anticuerpos anti-Sirt1 y anti-AcK16H4, para verificar la represión o activación transcripcional, respectivamente.

El tratamiento con Salermide produjo un incremento en el estado de acetilación de K16H4 en los 4 genes estudiados a nivel de promotor (Figura 29). Además, observamos que los promotores de estos 4 genes estaban ocupados por Sirt1 antes del tratamiento, lo cual explicaría su inactividad (Figura 29).

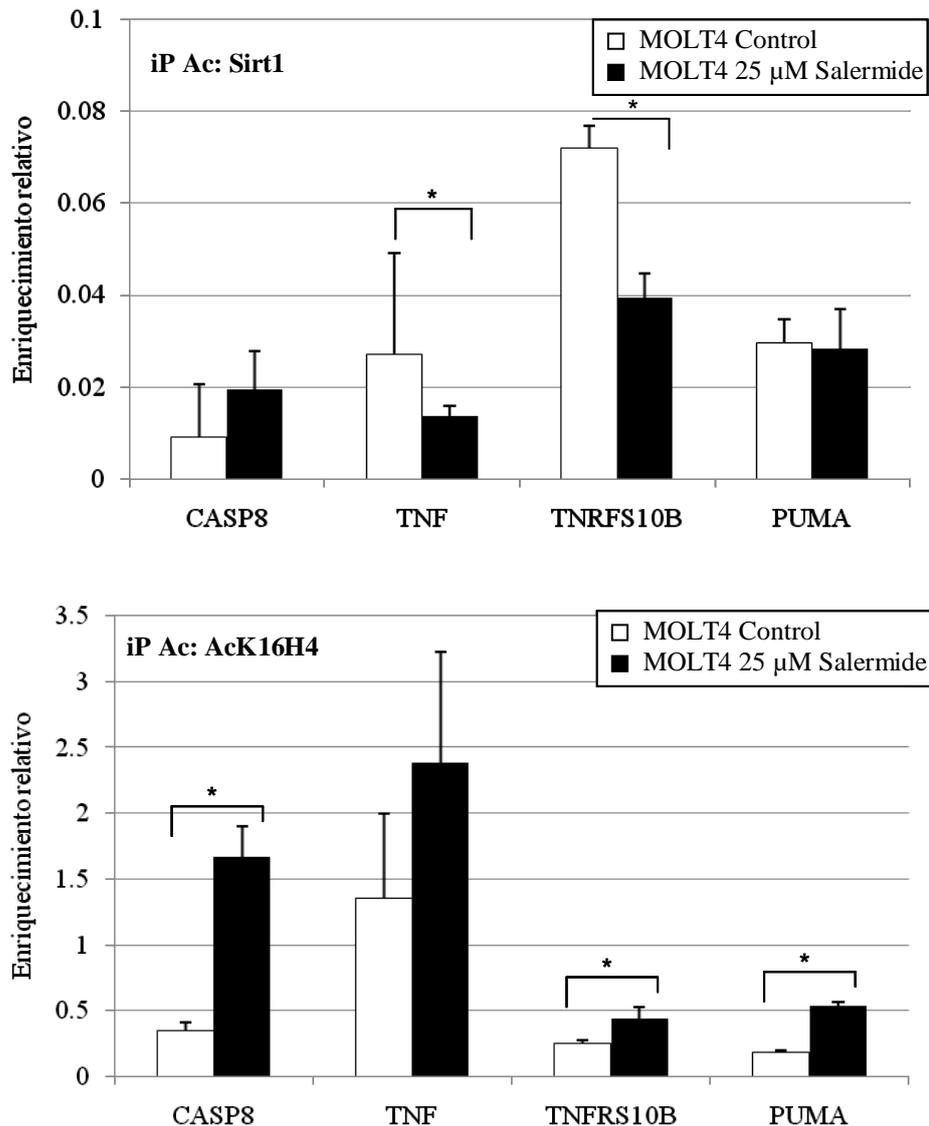


Figura 29: Ocupación del promotor de genes proapoptóticos (CASP8, TNF, TNFRS10B y PUMA) por ChiP cuantitativo en las células MOLT4 tratadas (barras negras) o no (barras blancas) con Salermide. Los anticuerpos utilizados para la inmunoprecipitación (iP Ac) son contra Sirt1 y contra AcK16H4. El enriquecimiento relativo se refiere al número de copias del gen de interés existente en la fracción inmunoprecipitada con el anticuerpo apropiado dividido entre el número de copias de este gen existente en fracción inmunoprecipitada con el anticuerpo control (H3). Los datos fueron sometidos al análisis estadístico de *t-student* (con un intervalo de confianza del 95%) para la comparación de medias entre el enriquecimiento relativo del gen de estudio tras la inmunoprecipitación con el anticuerpo específico en las células control y en las células tratadas con Salermide. *datos estadísticamente significativos (p -value ≤ 0.05).

Estos resultados sugirieron la hipótesis de partida, Sirt1 podría estar implicado en la represión aberrante de genes proapoptóticos en cáncer por un mecanismo que previene la acetilación de la lisina 16 de la histona H4 en sus respectivos promotores. El tratamiento con Salermide, que actúa específicamente a través de Sirt1, liberaría a estos promotores de la acción represora mediada por Sirt1 y promovería su reactivación por hiperacetilación específica de K16H4.

11- Estudio de la expresión de Sirt2 en líneas tumorales

Aunque en un principio habíamos determinado que Salermide tenía una mayor efectividad en la inhibición *in vitro* de Sirt2, luego observamos *in vivo* que la acción ejercida por Salermide sobre las células tumorales estaba mediada específicamente por la inhibición que ejercía sobre Sirt1.

Estudios previos indicaban una baja expresión de Sirt2 en tumores (HIRATSUKA *et al.* 2003). La falta de expresión de Sirt2 en las líneas utilizadas en el estudio de caracterización de Salermide podría ser la causa de que el inhibidor no actuara a través de esta vía.

Así pues, analizamos el grado de expresión de Sirt2 en varias líneas tumorales procedentes de leucemias y/o linfomas por PCR cuantitativa a tiempo real. Centramos el estudio en este tipo de líneas porque Salermide presentaba una actividad superior en líneas de tumores sanguíneos que en líneas de otros tipos tumoral, tales como colon y mama.

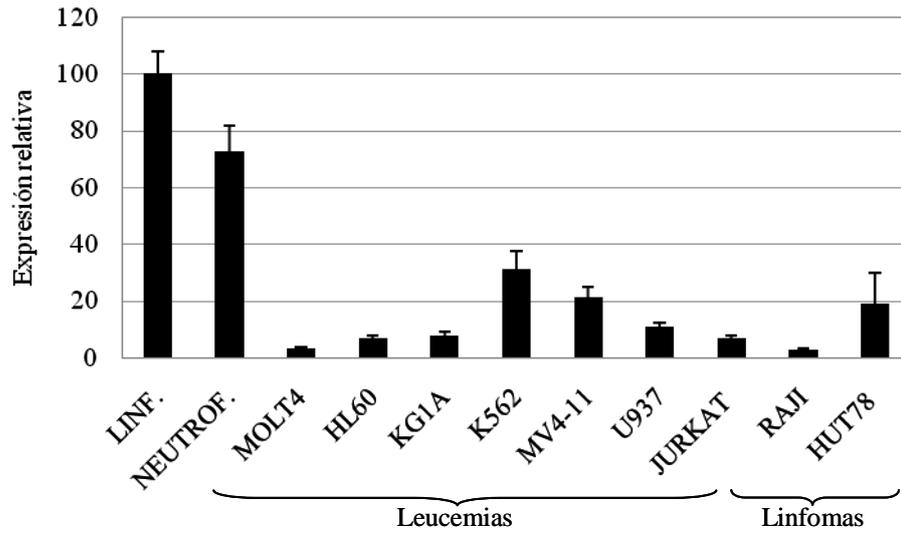


Figura 30: Expresión relativa de Sirt2 con respecto a la expresión del gen usado como referencia (GAPDH) en distintas líneas derivadas de leucemias y linfomas. Los linfocitos (LINF.) y neutrófilos (NEUTROF.) se utilizaron como controles de células no tumorales.

El análisis de PCR cuantitativa a tiempo real mostró que todas las líneas analizadas tenían una baja expresión de Sirt2 cuando las comparábamos con la expresión en linfocitos no tumorales (Figura 30).

A continuación investigamos si esta baja expresión podría deberse a la acción represora de la metilación del promotor del gen de Sirt2 o a la pérdida de acetilación a nivel del promotor. Para ello realizamos un tratamiento combinado con AZA y TSA en dos líneas derivadas de leucemia (MOLT4 y JURKAT) y en dos líneas derivadas de linfoma (RAJI y HUT 78).

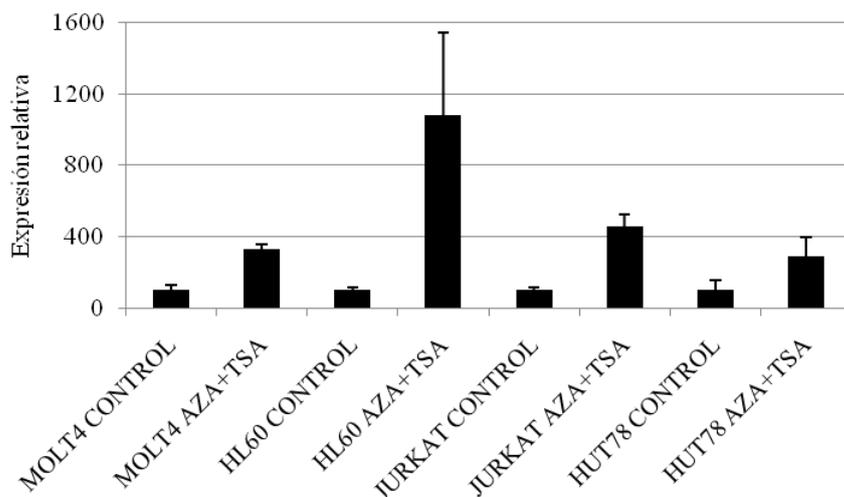


Figura 31: Cuantificación relativa de los niveles de expresión de Sirt2 en distintas líneas tumorales tratadas o no con la combinación de AZA y TSA en las condiciones descritas en material y métodos.

MOLT4, JURKAT y HUT78 expresaron Sirt2 aproximadamente 4 veces más que el control tras el tratamiento combinado de AZA y TSA, mientras que los niveles de Sirt2 en HL60 se incrementaron en más de 10 veces con respecto al control de células sin tratar (Figura 31). Todas las líneas sometidas al tratamiento combinado de AZA y TSA experimentaron un incremento de la expresión del gen de Sirt2 (Figura 31), lo que indicaba que la expresión de Sirt2 estaría regulada epigenéticamente en las líneas estudiadas.

A continuación estudiamos la regulación epigenética de Sirt2 a dos niveles: metilación del promotor y marcas de activación de histonas asociadas al promotor.

11.1 Metilación del promotor de Sirt2

Analizamos la metilación del promotor de Sirt2 mediante dos técnicas, secuenciación de bisulfito y pirosecuenciación, en tejidos no tumorales y en líneas celulares tumorales procedentes de leucemias y linfomas.

Mediante secuenciación de bisulfito estudiamos una región de 323 pb en el promotor del gen que incluía 24 CpGs.

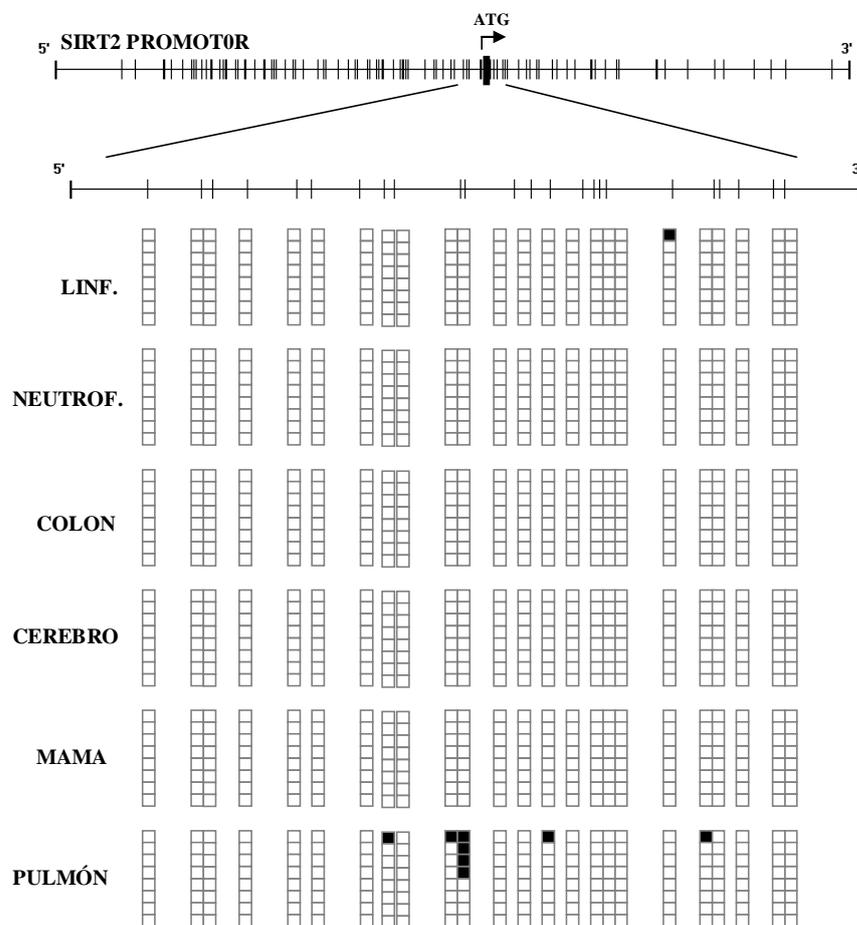


Figura 32: Secuenciación de bisulfito del promotor del gen de Sirt2 en diversos tejidos no tumorales. En la parte superior se muestra el promotor de Sirt2 y cada línea vertical indica una CpG que luego es representada en la parte inferior por un cuadradito. El color negro en cada uno de ellos indica la metilación de la CpG, mientras que el relleno blanco indica la falta de metilación. (LINF.: linfocitos y NEUTROF.: neutrófilos)

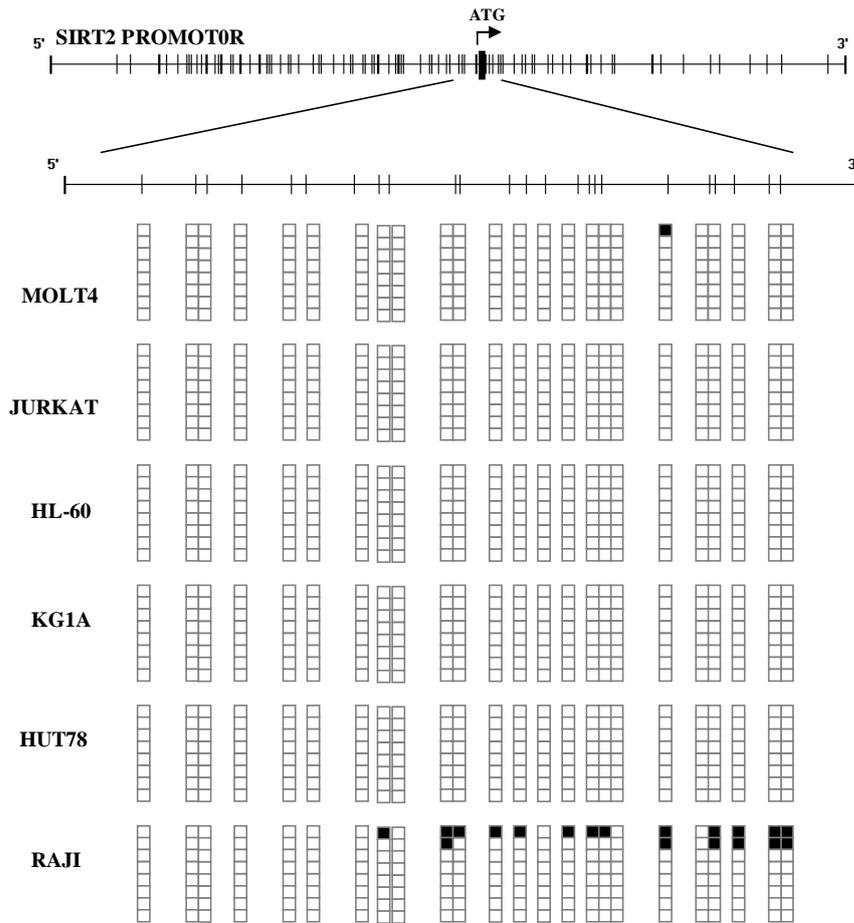


Figura 33: Secuenciación de bisulfito de líneas celulares derivadas de linfomas o leucemias.

Tras la realización de la técnica de secuenciación de bisulfito del promotor de Sirt2 no detectamos metilación en ninguno de los tejidos normales estudiados (Figura 32) ni en ninguna de las líneas tumorales (Figura 33). Solamente la línea celular RAJI derivada de un linfoma presentaba un indicio de metilación que no era significativo.

A continuación quisimos confirmar la falta de metilación del promotor de Sirt2 mediante pirosecuenciación. Por este método pudimos analizar 10 CpGs del promotor de Sirt2.

LÍNEA	% BS	% PIROSEC
MOLT4	0	6'05
JURKAT	0	5'72
HL60	0	10'67
KG1A	0	6'43
HUT78	0	n.d
RAJI	11'3	n.d
REH	n.d	6'23
U937	n.d	5'72

Tabla 4: Estudio comparativo entre los resultados de metilación del promotor de Sirt2 obtenido mediante secuenciación de bisulfito o mediante pirosecuenciación. n.d. no determinado. % BS: % metilación promedio obtenido por secuenciación de bisulfito. %PIROS: % metilación promedio obtenido por pirosecuenciación

Los resultados obtenidos del análisis del promotor por pirosecuenciación indicaron que ninguna de las líneas tumorales estudiadas presentaba una metilación significativa del promotor del gen de Sirt2 (Tabla 4).

Las dos técnicas utilizadas para el estudio de la metilación del promotor de Sirt2 nos indicaron que el promotor de Sirt2 no estaba metilado en las líneas tumorales de leucemias y linfomas. Aunque ambas nos daban la misma información general, podíamos comprobar que el porcentaje medio de metilación en el promotor de Sirt2 era siempre superior en los datos obtenidos de la pirosecuenciación (Tabla 4). Mediante la pirosecuenciación se analiza la metilación de miles de moléculas de DNA procedentes de una previa amplificación del gen de Sirt2 en la muestra, mientras que mediante secuenciación de bisulfito analizamos solamente de 8 a 10 moléculas de DNA de la muestra de origen. Por lo tanto, esta sería la explicación al hecho de que el porcentaje de metilación obtenido por pirosecuenciación sea fuera más elevado que el obtenido mediante secuenciación de bisulfito, que nos permite analizar sólo un número limitado de moléculas de DNA.

11.2 Acetilación de histonas a nivel del promotor de Sirt2

Una vez que habíamos descartado la metilación como causa de la baja expresión de Sirt2 en las leucemias y linfomas, nos propusimos estudiar más a fondo la implicación de la acetilación de histonas en esta regulación.

Analizamos la acetilación de histonas a nivel del promotor de Sirt2 mediante la tecnología de inmunoprecipitación de la cromatina (ChiP) en dos líneas de leucemias (MOLT4 y HL60), en donde se habían realizado los estudios previos de expresión y metilación, y sobre células no tumorales (linfocitos). Estudiamos la ocupación del promotor de Sirt2 por una marca global de activación génica, la acetilación global de la histona H4, y por una de las histonas que conforman el nucleosoma, la histona H3, utilizada como control positivo de la técnica.

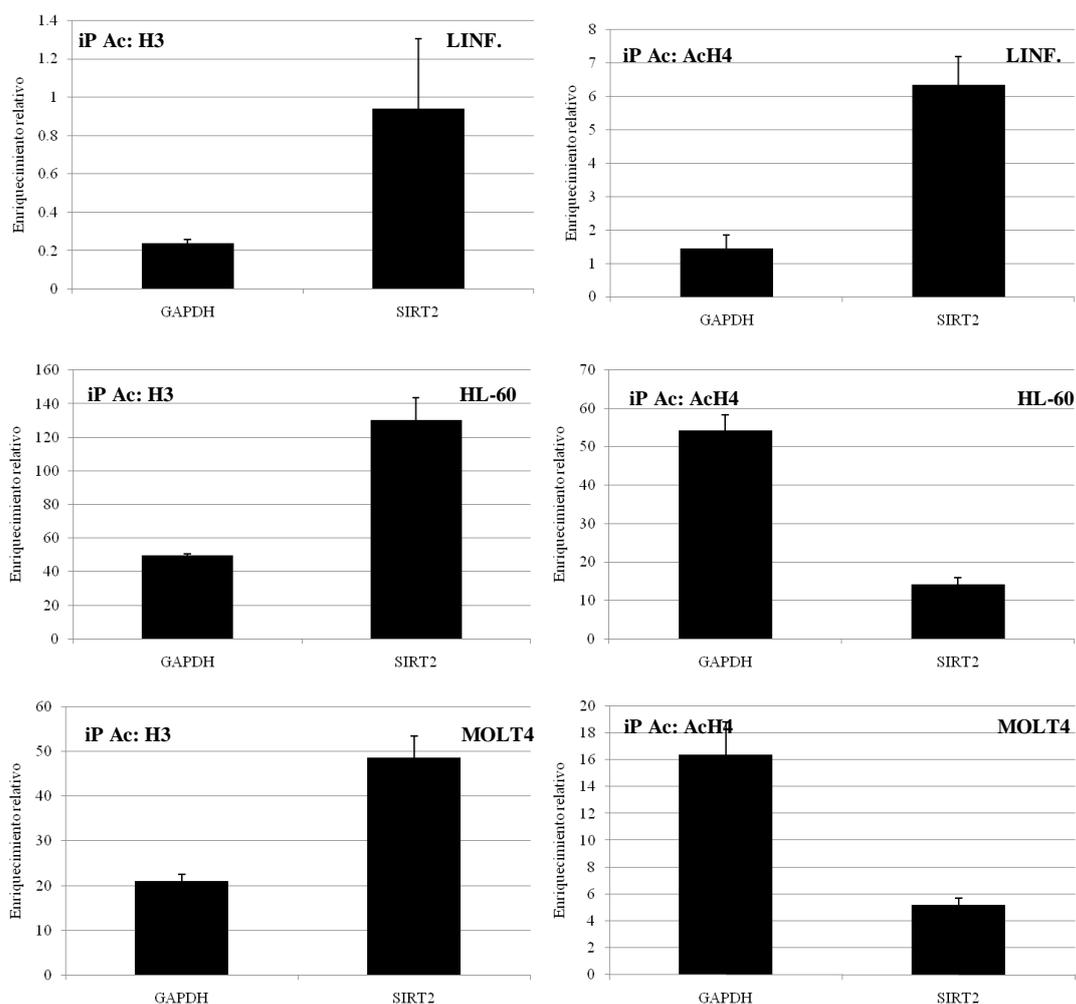


Figura 35: Estudio de la ocupación del promotor de Sirt2 y de GAPDH (usado como gen control) por la histona H3 (usada como control) y por la histona H4 acetilada (AcH4). El enriquecimiento relativo se refiere el número de copias del gen que contiene la fracción inmunoprecipitada con el anticuerpo específico (iP Ac) con respecto al número de copias que contiene la fracción no inmunoprecipitada. (LINF. linfocitos). Los datos fueron sometidos al análisis estadístico de *t-student* (con un intervalo de confianza del 95%) para la comparación de medias entre el enriquecimiento relativo del gen de estudio tras la inmunoprecipitación con el anticuerpo específico y el enriquecimiento relativo del gen de estudio tras la inmunoprecipitación con anti-IgG (control negativo de inmunoprecipitación). Todos los datos mostrados son estadísticamente significativos ($p\text{-value} \leq 0.05$).

El promotor del gen de Sirt2 en las líneas tumorales de leucemias, MOLT4 y HL-60, no estaba sometido a la marca de activación general génica, la acetilación de histonas. Cuando inmunoprecipitamos con el anticuerpo

específico de acetilación global de la histona H4, la amplificación de la región promotora de Sirt2 fue mucho menor que la obtenida con el gen control, GAPDH. Asimismo, también se observó que la amplificación de la región correspondiente al promotor de Sirt2 es inferior en el DNA obtenido de la inmunoprecipitación de la histona H4 acetilada que en el obtenido tras la inmunoprecipitación con el anticuerpo usado como control, anti-H3 (Figura 39). Otro dato importante es que en las células normales, en los linfocitos, no se observó tal diferencia en la amplificación del promotor de Sirt2, con lo cual podemos concluir que la expresión del gen de Sirt2 estaba regulada por la acetilación global de histonas en la región promotora del gen. En las líneas tumorales de leucemias, la expresión de Sirt2 se vería reprimida por una hipoacetilación de la histona H4 en la región promotora.

La baja expresión de Sirt2 mediada por una hipoacetilación de histonas a nivel de su promotor, podría ser la causa por la cual el inhibidor a estudio, Salermide, no podría ejercer su acción proapoptótica a través de la inhibición de Sirt2 *in vivo*. Aún cuando en el análisis previo de inhibición *in vitro* de Salermide, ésta era mucho más eficaz en la inhibición de Sirt2, *in vivo* pudimos comprobar que Salermide tenía una alta eficacia como agente antitumoral provocando un proceso apoptótico específico de líneas tumorales y que esta función la ejercía a través de la inhibición específica de Sirt1.

DISCUSIÓN

1- Evaluación de los efectos antiproliferativos y apoptóticos de los compuestos inhibidores de Sirtuinas

Las Sirtuinas son una familia de desacetilasas de histonas (HDACs) formada por siete miembros (Sirt1 a Sirt7) dependientes de NAD⁺ para ejercer su actividad. El miembro de esta familia mejor caracterizado es Sirt1. Sirt1 tiene muchas dianas de acción ya descritas, tanto histonas como otras proteínas, aunque una de las dianas de acción más relevante es el factor de transcripción p53. Sirt1 desacetila a p53 provocando su represión. Esto se ha relacionado con un incremento de la esperanza de vida y de la supervivencia celular asociada al estrés (CHEN *et al.* 2005).

Se ha demostrado que la modulación de la actividad enzimática de las Sirtuinas puede tener efectos beneficiosos en ciertas enfermedades, por lo que se ha extendido el interés de desarrollar nuevos compuestos que puedan producir un efecto favorable en el organismo modulando la actividad de estas enzimas.

Se han descrito varios compuestos inhibidores de Sirt1 que podrían tener un efecto anticancerígeno por activación de la ruta apoptótica mediada por p53 en las células tumorales. Recientemente se ha descrito un nuevo compuesto (*Compuesto 1*) que deriva de otro inhibidor de Sirtuinas, NCS-12k, que inhibe específicamente a Sirt1 y produce hiperacetilación de p53 en la línea derivada de cáncer colorrectal HCT-116, pero su papel como agente antitumoral necesita ser estudiado en profundidad (SUZUKI *et al.* 2009).

Además, otro de los objetivos para el desarrollo de nuevos fármacos es la modulación de Sirt2. Sirt2 es una enzima perteneciente al grupo de las Sirtuinas predominantemente citoplasmática, aunque se ha demostrado que durante la mitosis se encuentra asociada a las estructuras mitóticas del núcleo para ejercer un efecto controlador de la progresión del ciclo celular (DRYDEN *et al.* 2003). Además Sirt2 también puede reprimir la actividad de p53 a través de la interacción con las proteínas 14-3-3 (JIN *et al.* 2008). Recientemente se ha descrito un nuevo compuesto llamado AC-93253 que inhibe específicamente a Sirt2 y produce una citotoxicidad selectiva en líneas celulares tumorales (ZHANG *et al.* 2009b).

Sin embargo, la mayoría de los compuestos estudiados descritos como inhibidores de Sirtuinas no muestra especificidad en la inhibición de un tipo de Sirtuina en particular. Por ejemplo, el Cambinol, descrito como inhibidor de Sirt1 y Sirt2 también muestra capacidades antitumorales mediadas por hiperacetilación de p53 y BCL6 (HELTWEG *et al.* 2006).

El Sirtinol es un compuesto desarrollado inicialmente por Grozinger *et al.* (GROZINGER *et al.* 2001). En un principio se describió que tenía una potente actividad inhibidora *in vitro* de Sirt2, pero más adelante se vio implicado en la acción sobre Sirt1. El Sirtinol produce arresto del ciclo celular en ciertas líneas tumorales acompañado de una activación de la cascada de MAPK (Ras-mitogen-activated protein kinase) (OTA *et al.* 2006).

En colaboración con el Dr. Mai diseñamos y sintetizamos 10 nuevos compuestos con la finalidad de describir alguno de ellos como un compuesto mejorado capaz de inhibir con mayor eficiencia el crecimiento de células tumorales que el Sirtinol. Sintetizamos aquellos 10 compuestos que, en base a estudios previos de modelaje tridimensional y acoplamiento mediante el programa GOLD, nos ofrecían una mayor probabilidad de interacción con el centro activo de la enzima (Sirt2).

De los 10 compuestos estudiados, solamente cinco reunían las características de inhibición *in vitro* de la actividad enzimática de Sirtuinas y disminución de la proliferación celular de tumores. Entre todos ellos elegimos el compuesto MC1776, al que denominamos Salermide, para realizar un estudio más detallado de sus actividades sobre tumores. Elegimos este inhibidor porque presentaba una alta tasa de inhibición *in vitro* de la actividad enzimática de Sirtuinas (hecho apoyado por su estructura química) y porque era el único que mostraba efectos antiproliferativos sobre líneas tumorales de diverso origen, colon, mama y leucemia.

Un dato relevante es que 6 de los 10 compuestos que producían una disminución de células viables del cultivo, lo hacían sobre líneas derivadas de tumores sanguíneos. Esto hace pensar que las células procedentes de estos tipos tumorales (leucemias y linfomas) son mucho más sensibles a la acción de los inhibidores de Sirtuinas que las células procedentes de tumores sólidos. Lo

mismo se ha descrito con los inhibidores de desacetilasas de histonas de clase I y II; que presentan una demostrada actividad contra tumores sanguíneos que los ha hecho muy válidos para el estudio sobre pacientes aquejados de distintos tipos de leucemias y linfomas. Actualmente se están realizando unos 30 ensayos en pacientes con linfoma y 20 ensayos en pacientes con leucemia en los que se utilizan distintos HDACi (vorinostato, panobinostato o romidepsina) para el tratamiento de la enfermedad (<http://clinicaltrials.gov/>).

Por lo tanto, quizás no sería demasiado prudente el descarte de esos cinco compuestos (MC1591, MC1775, MC1793, MC1801 y MC1808), que aún no teniendo una acción antiproliferativa de amplio espectro, podrían ser utilizados en estudios dirigidos contra la viabilidad y apoptosis de células tumorales derivadas de tumores sanguíneos. No obstante, se debería examinar cuidadosamente su actividad sobre células no tumorales y comprobar que no tiene toxicidad alguna en modelos animales. Además la caracterización de sus dianas de acción nos daría la base de un tratamiento dirigido para garantizar una respuesta favorable.

2- Evaluación *in vivo* de los efectos de Salermide sobre el crecimiento tumoral

Ya que la finalidad de la síntesis de estos compuestos es, en su mayor parte, la administración sobre pacientes para el tratamiento de enfermedades, se debería estudiar el efecto de los HDACi sobre células sanas que no presentan patología alguna. En la mayoría de los estudios publicados que caracterizan un nuevo compuesto con actividad HDACi se realiza un estudio detallado de los efectos inducidos sobre las células tumorales, pero se relega el análisis del inhibidor sobre células no malignas. Por ejemplo, uno de los estudios recientes que caracterizan a un nuevo inhibidor de HDAC, el compuesto denominado FR235222, realiza una descripción detallada del efecto que ejerce sobre la línea de leucemia U937. Los autores describen que el nuevo inhibidor inhibe la proliferación celular mediante el arresto en fase G1 del ciclo celular en la línea U937, sin embargo no se detalla el efecto causado en células sanas no tumorales (PETRELLA *et al.* 2008).

Por esta razón consideramos necesario evaluar cualquier actividad sobre la viabilidad celular que pudiera provocar Salermide en un modelo no tumoral.

Nuestros datos revelaron que Salermide no producía toxicidad en el modelo murino elegido y que además promovía un proceso apoptótico en todas las líneas cancerosas estudiadas de origen diverso (linfoma, leucemia, cáncer colorrectal y cáncer de mama), pero no en fibroblastos no tumorales (MRC5).

Además de la especificidad de acción sobre células tumorales, comprobamos que altas dosis de Salermide no producían efectos aparentes de toxicidad en el modelo murino utilizado, por lo cual Salermide podría incluirse en estudios más exhaustivos dirigidos a la caracterización de sus efectos *in vivo* sobre modelos no tumorales que autorizaran su inclusión en ensayos clínicos en pacientes con cáncer.

3- Caracterización de la actividad apoptótica mediada por Salermide

Salermide inhibe las actividades enzimáticas de Sirt1 y Sirt2. Tiene un efecto inhibitor más potente sobre Sirt2 que sobre Sirt1, inhibiendo un 80% de la actividad de desacetilación a una concentración de 25 μM para Sirt2 y de 90 μM para Sirt1.

En base a estos resultados, pensamos que probablemente el efecto apoptótico mediado por Salermide se debiera a la inhibición enzimática que ejercía sobre Sirt2. Para ello estudiamos el efecto de la inhibición de Sirt2 mediante RNA de interferencia en la apoptosis celular de MOLT4, línea en donde Salermide ejercía un mayor efecto antiproliferativo, y observamos que esta disminución en la expresión no producía un incremento en el porcentaje de células apoptóticas del cultivo. Esto nos hizo pensar que si la inhibición de la expresión de Sirt2 no tenía efecto sobre la apoptosis, entonces Salermide, que provoca una inducción masiva de la apoptosis en MOLT4, no debía de actuar primariamente a través de esta enzima. Aún así corroboramos la independencia de la actividad proapoptótica de Salermide con la inhibición de Sirt2 analizando los efectos del inhibidor sobre la acetilación de dos dianas de acción reconocidas de esta enzima, α -tubulina (NORTH *et al.* 2003) y K16H4

(VAQUERO *et al.* 2006). Observamos que tras el tratamiento de las células tumorales con el inhibidor no se producía el incremento en la acetilación de las proteínas diana que cabría esperar si Salermide actuara inhibiendo la actividad de Sirt2.

Por lo tanto, a continuación desviamos nuestra atención al estudio de una posible implicación de la inhibición de Sirt1 por Salermide en el proceso apoptótico. Esta posible relación se basaba en el hecho de que tanto nuestro grupo como otros habíamos observado que tras la inhibición de Sirt1 se observaba un incremento de la apoptosis en el cultivo celular. Por ejemplo, Yamakuchi *et al.* (YAMAKUCHI *et al.* 2008) relacionaron directamente la inhibición de Sirt1 mediante miR-34a con un aumento de la apoptosis específico de células tumorales. Además en la línea tumoral de pulmón A549 la inhibición de Sirt1 por oligonucleótidos específicos también inducía apoptosis (SUN *et al.* 2007).

En el estudio que realizamos con MOLT4 relacionamos un 70% de inhibición de Sirt1 mediante interferencia del RNA con un incremento de apoptosis del 10% respecto a las células control. Además, este porcentaje de apoptosis era aproximadamente el mismo que cuando tratábamos las células con el inhibidor, lo cual parecía indicar que esta apoptosis estaba producida por una inhibición de Sirt1.

Tras comprobar que el tratamiento con Salermide de las líneas tumorales SW480 y MDA-MB-231 no incrementaba los niveles de acetilación de p53 y que MOLT4, la línea sobre la que Salermide ejercía una mayor actividad apoptótica era deficiente en p53, confirmamos que la apoptosis celular inducida tras el tratamiento con el inhibidor era independiente de p53, lo cual eliminaba una de nuestras premisas, que Salermide pudiera producir reactivación de p53 mediada por la inhibición de Sirt1 y/o Sirt2 desencadenando así todo el proceso apoptótico. La inducción de apoptosis por HDACi independiente de p53 ya se había descrito anteriormente. Por ejemplo, el SAHA provocaba apoptosis de células tumorales de mama, de hígado y de la cavidad oral por un proceso mediado por la vía de señalización de TRAIL (CARLISI *et al.* 2009; SHANKAR *et al.* 2009; YEH *et al.* 2009). Además, también se había descrito que el Sirtinol, utilizado como patrón para el diseño de estos

nuevos compuestos, presentaba una actividad independiente de p53 (OTA *et al.* 2006).

Una vez descartada la implicación de la hiperacetilación y activación de p53 por la inhibición de Sirt1 mediada por Salermide, decidimos investigar otra vía de acción.

El tratamiento con Salermide indujo la reactivación de genes implicados en el proceso apoptótico (CASP8, TNF o PUMA) que estaban aberrantemente reprimidos por la actividad de desacetilación ejercida por Sirt1 sobre sus promotores. Esta reactivación iba acompañada además por un aumento de la acetilación de K16H4 en su región promotora, lo que sugería que Sirt1 podría estar implicado en la represión aberrante de genes proapoptóticos en cáncer por un mecanismo que previene la acetilación de K16H4 en sus promotores. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que una desacetilación de K16H4 mediada por Sirt1 en los promotores de genes antiapoptóticos produce su represión transcripcional, pudiendo desembocar en un proceso tumoral (PRUITT *et al.* 2006).

Aunque nuestro estudio sugiere que uno de los mecanismos moleculares por los que Salermide induce apoptosis exclusivamente en células tumorales es la reactivación de genes proapoptóticos aberrantemente silenciados por Sirt1, no podemos excluir que existen otras posibilidades. Estos otros mecanismos podrían implicar a otros genes y proteínas diana de Sirt1, como pueden ser los factores de transcripción FOXO, NF- κ B y E2F, la acetiltransferasa de histonas p300 o el factor de reparación del DNA Ku70 (revisado en (GUARENTE and PICARD 2005)) . De hecho, algunas de estas dianas, como NF- κ B y E2F, tienen funciones importantes en las vías apoptóticas.

4- El papel de Sirt1 en cáncer

El estudio llevado a cabo en esta tesis doctoral tiene como conclusión que la inhibición específica de la actividad de Sirt1 por Salermide produce una

apoptosis exclusiva en células tumorales sin que se vean afectadas las células normales. El proceso apoptótico desencadenado por Salermide es consecuencia, al menos en parte, de una reactivación de genes proapoptóticos reprimidos por desacetilación a nivel de promotores mediada por Sirt1.

Hay además otros muchos estudios que implican a Sirt1 como promotor de un proceso tumoral, apoyado por la observación de que esta enzima tiene una expresión muy elevada, respecto a las células normales, en muchos tipos tumorales, próstata, leucemia, colon, piel... La expresión de Sirt1 puede estar ligada al desarrollo de un proceso tumoral principalmente por el efecto que ejerce en la inhibición de genes supresores tumorales implicados tanto en la reparación del daño en el DNA (por ejemplo Ku70 (COHEN *et al.* 2004b) o NBS1 (YUAN *et al.* 2007)) como en el ciclo celular y apoptosis (FOXO (BRUNET *et al.* 2004), Rb (HITCHINS *et al.* 2007), HIC1 (TSENG *et al.* 2009), p53 (VAZIRI *et al.* 2001)).

Sin duda alguna la diana más estudiada de Sirt1 es p53 (VAZIRI *et al.* 2001). La sobreexpresión de Sirt1 produciría una inactivación por desacetilación de p53, con lo cual todas aquellas células que portaran algún daño en el DNA posible inductor de tumorigenicidad serían incapaces de detener su división celular y entrar en apoptosis, desarrollando así la formación de un tumor. Apoyando esta idea existen varios estudios, entre los que se encuentra el de Salermide, en los que inhibiendo la actividad de Sirt1 se produce una disminución en el crecimiento de las células tumorales. Se establecería así una relación directa entre actividad de Sirt1 y cáncer, sin embargo, esta conexión no parece estar tan clara en otros estudios, que describen a Sirt1 como un supresor tumoral.

La idea de que Sirt1 podría actuar como un supresor tumoral se basa, al igual que en el caso contrario, en que otros tipos de cáncer, glioblastoma y carcinomas de vejiga, ovario y próstata, muestran una expresión muy reducida de esta proteína. Se ha observado que la sobre-expresión de Sirt1 produce un descenso en la formación de tumores de colon en ratones APC^{min/+} que puede estar debido a la localización citoplasmática de β -catenina desacetilada (FIRESTEIN *et al.* 2008). Además se ha demostrado que Sirt1 tiene una función

reguladora en la reparación de la rotura de la doble hélice del DNA y en el mantenimiento de la integridad genómica contribuyendo a la hipermetilación de las secuencias altamente repetitivas (OBERDOERFFER *et al.* 2008).

Por todo ello, al igual que hay toda una línea de investigación y desarrollo de compuestos inhibidores de Sirt1, se ha abierto otra con la finalidad contraria, el desarrollo de compuestos activadores de Sirt1. Uno de los compuestos más conocidos que sigue esta línea es el Resveratrol.

El Resveratrol es un polifenol presente de forma natural en la piel de la uva con efecto cardio y neuroprotector. Las dianas de acción incluye ciclooxigenasas, lipo-oxigenasas, quinasas, DNA polimerasa y Sirtuinas. Sin embargo, el estudio del Resveratrol está dirigido principalmente a sus efectos sobre el envejecimiento celular mediados por la activación de Sirt1 y similares a los causados por la restricción calórica. Se ha demostrado que tiene un efecto protector de ciertas enfermedades relacionadas con el envejecimiento, como la diabetes de tipo II o enfermedades cardíacas y neurodegenerativas (MILNE *et al.* 2007). En cambio, la función que puede ejercer el Resveratrol en los efectos antitumorales producidos por la expresión de Sirt1 necesita un estudio mucho más detallado.

No debemos olvidar que un factor determinante para la aceptación de nuevos compuestos usados como antitumorales es su seguridad en los pacientes. No hay duda de que hay datos conflictivos en cuanto a la actividad de Sirt1 *in vitro* como gen supresor tumoral o como oncogén y también en los efectos que causa la desregulación de esta enzima en el incremento del riesgo de cáncer y en la supervivencia de las células tumorales.

Es importante tener en cuenta que la regulación de Sirt1 por restricción calórica es específica de tejido, incrementando los niveles en tejido adiposo blanco, músculo, páncreas, pero disminuyéndolos en hígado. Por lo tanto, los efectos en el organismo de compuestos que mimetizan la acción de la restricción calórica, como el Resveratrol, pueden tener implicaciones más complejas de lo que en un principio podríamos esperar. Un activador de Sirt1 administrado a nivel sistémico podría incrementar el metabolismo en adipocitos

y células musculares reduciendo la acumulación de grasa, pero a nivel hepático induciría la síntesis de grasa y colesterol aumentando el riesgo de cáncer en pacientes con predisposición genética. Sería por lo tanto deseable, un tipo de terapia dirigida a un tejido en concreto con el fin de minimizar cualquier efecto colateral.

5- Expresión de Sirt2 en tumores y consecuencias en la actividad mediada por Salermide

Aún cuando los resultados obtenidos parecen indicar una especificidad de acción de Salermide sobre Sirt1, nos pareció interesante elucidar la causa de la falta de actividad del compuesto *in vivo* sobre Sirt2 cuando *in vitro* esta inhibición era muy potente.

Debido a la baja expresión de Sirt2 que detectamos en la línea de estudio MOLT4 y, en general, en un amplio panel de líneas tumorales de leucemias y linfomas, llegamos a la conclusión de que probablemente Sirt2 no fuera la principal responsable de la acción mediada por Salermide.

Estudiamos la posible implicación de dos mecanismos epigenéticos, metilación del promotor y modificaciones de histonas asociadas al promotor de Sirt2, en la expresión de Sirt2. Deducimos que la baja expresión de Sirt2 en las líneas estudiadas no se debía a una hipermetilación del promotor. Sin embargo, nuestros resultados indicaban que Sirt2 estaba regulada epigenéticamente a nivel de promotor por una marca general de transcripción génica, la acetilación de la histona H4. La pérdida de esta marca, detectada exclusivamente en células tumorales (MOLT4 y HL60) produciría un descenso en la transcripción y expresión del gen de Sirt2. Estos resultados corroboraban los datos de baja expresión de Sirt2 descritos previamente (INOUE *et al.* 2007b).

La baja expresión de Sirt2 en tumores ya se había descrito en gliomas haciendo pensar que quizás Sirt2 pudiera tener alguna función como gen supresor tumoral (HIRATSUKA *et al.* 2003). Sin embargo, el estudio de nuevos compuestos, como las Tenovinas (LAIN *et al.* 2008) o ciertos derivados de tiobarbiturato (UCIECHOWSKA *et al.* 2008), que están implicados en la inducción de apoptosis, son capaces de inhibir tanto a Sirt1 como a Sirt2. El que no se

haya determinado exactamente el mecanismo de acción de estos compuestos no descarta la posibilidad de que la inhibición de Sirt2 tenga alguna implicación en apoptosis de las células tumorales.

Además cabe destacar la importancia que Sirt2 ejerce sobre la progresión del ciclo celular, que la podría convertir en un modulador imprescindible de la proliferación de células tumorales. Una de las dianas principales de la actividad de Sirt2 es α -tubulina. Las moléculas de α -tubulina acetiladas están estrechamente ligada a la estabilidad de los microtúbulos (PIPERNO *et al.* 1987). Así pues, se podría pensar que Sirt2 podría afectar a la regulación de los procesos celulares regulados por la tubulina, es decir, la mitosis, organización celular, transporte y motilidad celular.

Sirt2 está implicada en el proceso mitótico regulando la transición de la fase G2 a la fase M. En el punto de control del ciclo celular G2/M, los niveles de Sirt2 son muy elevados y para que la célula pueda continuar su proceso de división celular por entrada en fase M parece que necesario un descenso de los niveles de Sirt2 (DRYDEN *et al.* 2003). Por lo tanto, en este aspecto, sería conveniente el uso de ciertos compuestos activadores de Sirt2 que impidieran así la progresión del ciclo celular de las células tumorales.

Los mecanismos por los cuales Sirt2 regula la entrada de las células en mitosis no están claros, pero podrían estar asociados a una desacetilación de la tubulina y a una condensación de la cromatina mediada por la desacetilación de K16H4 (otra de las dianas de acción de Sirt2)

Sin embargo, cabe destacar que se han descrito efectos positivos de la inhibición de Sirt2 en la proliferación de células tumorales cuando están siendo tratadas además con inhibidores de microtúbulos (OGI *et al.* 2005). La disminución en la expresión de Sirt2 de las células tumorales impediría el arresto celular en fase G2/M, lo que las haría más sensibles a la acción de estos inhibidores.

Además, no aún falta por elucidar si la baja expresión de Sirt2 en las células de glioma es consecuencia de una delección de la región cromosómica que contiene al gen, o bien, es la causa del desarrollo tumoral directamente relacionado con la función oncogénica de Sirt2.

Por lo tanto, existe una controversia entre el efecto anti- y pro-tumoral que tiene la acción de Sirt2 que necesita ser aclarado y que probablemente sea dependiente del tipo celular y de otros factores aún no descritos.

CONCLUSIONES

1- En el presente trabajo se han diseñado y sintetizado 10 nuevos compuestos que inhiben *in vitro* a Sirt1 y/o Sirt2.

2- Siete de los nuevos compuestos diseñados inducen apoptosis en la línea tumoral U937 y uno de ellos induce diferenciación monocítica en la misma línea.

3- Uno de los nuevos compuestos sintetizados, el MC1776, al que denominamos Salermide, muestra una alta eficiencia de inhibición *in vitro* tanto de Sirt1 como de Sirt2.

4- Salermide disminuye la proliferación de líneas tumorales derivadas de leucemias (MOLT4, KG1A, K562), de linfomas (RAJI), de cáncer de mama (MDA-MB-231) y de cáncer de colon (SW480) induciendo apoptosis. Salermide tiene una actividad apoptótica más potente sobre líneas tumorales derivadas de leucemias, siendo el IC50 para MOLT4 de 18 μ M.

5- El efecto proapoptótico producido por Salermide depende de la dosis y del tipo celular.

6- Salermide no afecta a las células no tumorales y no es tóxica en ratones inmunodeprimidos.

7- Salermide no produce apoptosis a través de la inhibición de Sirt2. Esta falta de inhibición puede ser consecuencia de una represión epigenética mediada por la desacetilación de histonas a nivel de promotor de Sirt2 que impide su expresión normal en las líneas tumorales usadas en el estudio.

8- Salermide induce muerte celular por apoptosis en la línea de cáncer hematopoyético humano MOLT4 a través de un mecanismo que implica la pérdida de represión transcripcional de genes proapoptóticos mediada por la acción de Sirt1. Salermide dificulta la unión de Sirt1 y favorece la de K16H4

acetilada a los promotores de genes proapoptóticos desencadenando un proceso de activación transcripcional.

BIBLIOGRAFÍA

- ABDELMOHSEN, K., R. PULLMANN, JR., A. LAL, H. H. KIM, S. GALBAN *et al.*, 2007 Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression. *Mol Cell* **25**: 543-557.
- AGRICOLA, E., L. VERDONE, E. DI MAURO and M. CASERTA, 2006 H4 acetylation does not replace H3 acetylation in chromatin remodelling and transcription activation of Adr1-dependent genes. *Mol Microbiol* **62**: 1433-1446.
- AHMAD, K., and S. HENIKOFF, 2002 The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol Cell* **9**: 1191-1200.
- AHUJA, N., B. SCHWER, S. CAROBBIO, D. WALTREGNY, B. J. NORTH *et al.*, 2007 Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem* **282**: 33583-33592.
- ALLISON, S. J., and J. MILNER, 2003 Loss of p53 has site-specific effects on histone H3 modification, including serine 10 phosphorylation important for maintenance of ploidy. *Cancer Res* **63**: 6674-6679.
- ARGMANN, C., and J. AUWERX, 2006 Insulin secretion: SIRT4 gets in on the act. *Cell* **126**: 837-839.
- ASHKTORAB, H., K. BELGRAVE, F. HOSSEINKHAH, H. BRIM, M. NOURAIIE *et al.*, 2009 Global histone H4 acetylation and HDAC2 expression in colon adenoma and carcinoma. *Dig Dis Sci* **54**: 2109-2117.
- ASHRAF, N., S. ZINO, A. MACINTYRE, D. KINGSMORE, A. P. PAYNE *et al.*, 2006 Altered sirtuin expression is associated with node-positive breast cancer. *Br J Cancer* **95**: 1056-1061.
- BACHMAN, K. E., B. H. PARK, I. RHEE, H. RAJAGOPALAN, J. G. HERMAN *et al.*, 2003 Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene. *Cancer Cell* **3**: 89-95.
- BANKS, A. S., N. KON, C. KNIGHT, M. MATSUMOTO, R. GUTIERREZ-JUAREZ *et al.*, 2008 SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell Metab* **8**: 333-341.
- BASCHNAGEL, A., A. RUSSO, W. E. BURGAN, D. CARTER, K. BEAM *et al.*, 2009 Vorinostat enhances the radiosensitivity of a breast cancer brain metastatic cell line grown in vitro and as intracranial xenografts. *Mol Cancer Ther* **8**: 1589-1595.
- BASSETT, A., S. COOPER, C. WU and A. TRAVERS, 2009 The folding and unfolding of eukaryotic chromatin. *Curr Opin Genet Dev* **19**: 159-165.
- BEDALOV, A., T. GATBONTON, W. P. IRVINE, D. E. GOTTSCHLING and J. A. SIMON, 2001 Identification of a small molecule inhibitor of Sir2p. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 15113-15118.
- BIRD, A., 2002 DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* **16**: 6-21.
- BIRD, A., 2007 Perceptions of epigenetics. *Nature* **447**: 396-398.
- BJERLING, P., and K. EK WALL, 2002 Centromere domain organization and histone modifications. *Braz J Med Biol Res* **35**: 499-507.
- BLACK, J. C., A. MOSLEY, T. KITADA, M. WASHBURN and M. CAREY, 2008 The SIRT2 deacetylase regulates autoacetylation of p300. *Mol Cell* **32**: 449-455.
- BLAHETA, R. A., H. NAU, M. MICHAELIS and J. CINATL, JR., 2002 Valproate and valproate-analogues: potent tools to fight against cancer. *Curr Med Chem* **9**: 1417-1433.

- BOYAULT, C., B. GILQUIN, Y. ZHANG, V. RYBIN, E. GARMAN *et al.*, 2006 HDAC6-p97/VCP controlled polyubiquitin chain turnover. *Embo J* **25**: 3357-3366.
- BRACKER, T. U., A. SOMMER, I. FICHTNER, H. FAUS, B. HAENDLER *et al.*, 2009 Efficacy of MS-275, a selective inhibitor of class I histone deacetylases, in human colon cancer models. *Int J Oncol* **35**: 909-920.
- BRADBURY, C. A., F. L. KHANIM, R. HAYDEN, C. M. BUNCE, D. A. WHITE *et al.*, 2005 Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors. *Leukemia* **19**: 1751-1759.
- BRUNET, A., L. B. SWEENEY, J. F. STURGILL, K. F. CHUA, P. L. GREER *et al.*, 2004 Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* **303**: 2011-2015.
- BUTLER, L. M., D. B. AGUS, H. I. SCHER, B. HIGGINS, A. ROSE *et al.*, 2000 Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses the growth of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* **60**: 5165-5170.
- BUTTINELLI, M., G. PANETTA, D. RHODES and A. TRAVERS, 1999 The role of histone H1 in chromatin condensation and transcriptional repression. *Genetica* **106**: 117-124.
- CALLINAN, P. A., and A. P. FEINBERG, 2006 The emerging science of epigenomics. *Hum Mol Genet* **15 Spec No 1**: R95-101.
- CAMPOREALE, G., E. E. SHUBERT, G. SARATH, R. CERNY and J. ZEMPLINI, 2004 K8 and K12 are biotinylated in human histone H4. *Eur J Biochem* **271**: 2257-2263.
- CAO, R., Y. TSUKADA and Y. ZHANG, 2005 Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Mol Cell* **20**: 845-854.
- CARDUCCI, M. A., J. B. NELSON, K. M. CHAN-TACK, S. R. AYYAGARI, W. H. SWEATT *et al.*, 1996 Phenylbutyrate induces apoptosis in human prostate cancer and is more potent than phenylacetate. *Clin Cancer Res* **2**: 379-387.
- CARLISI, D., M. LAURICELLA, A. D'ANNEO, S. EMANUELE, L. ANGILERI *et al.*, 2009 The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid sensitises human hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by TRAIL-DISC activation. *Eur J Cancer* **45**: 2425-2438.
- CARROZZA, M. J., R. T. UTLEY, J. L. WORKMAN and J. COTE, 2003 The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet* **19**: 321-329.
- CELESTE, A., O. FERNANDEZ-CAPETILLO, M. J. KRHLAK, D. R. PILCH, D. W. STAUDT *et al.*, 2003 Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol* **5**: 675-679.
- CHADEE, D. N., M. J. HENDZEL, C. P. TYLIPSKI, C. D. ALLIS, D. P. BAZETT-JONES *et al.*, 1999 Increased Ser-10 phosphorylation of histone H3 in mitogen-stimulated and oncogene-transformed mouse fibroblasts. *J Biol Chem* **274**: 24914-24920.
- CHEN, F., and P. D. WAGNER, 1994 14-3-3 proteins bind to histone and affect both histone phosphorylation and dephosphorylation. *FEBS Lett* **347**: 128-132.
- CHEN, W. Y., D. H. WANG, R. C. YEN, J. LUO, W. GU *et al.*, 2005 Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell* **123**: 437-448.

- CHEN, Z., S. CLARK, M. BIRKELAND, C. M. SUNG, A. LAGO *et al.*, 2002 Induction and superinduction of growth arrest and DNA damage gene 45 (GADD45) alpha and beta messenger RNAs by histone deacetylase inhibitors trichostatin A (TSA) and butyrate in SW620 human colon carcinoma cells. *Cancer Lett* **188**: 127-140.
- CHEN, Z., J. ZANG, J. WHETSTINE, X. HONG, F. DAVRAZOU *et al.*, 2006 Structural insights into histone demethylation by JMJD2 family members. *Cell* **125**: 691-702.
- CHIANI, F., F. DI FELICE and G. CAMILLONI, 2006 SIR2 modifies histone H4-K16 acetylation and affects superhelicity in the ARS region of plasmid chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **34**: 5426-5437.
- CINATL, J., JR., J. CINATL, P. H. DRIEVER, R. KOTCHETKOV, P. POUCKOVA *et al.*, 1997 Sodium valproate inhibits in vivo growth of human neuroblastoma cells. *Anticancer Drugs* **8**: 958-963.
- CINATL, J., JR., J. CINATL, M. SCHOLZ, P. H. DRIEVER, D. HENRICH *et al.*, 1996 Antitumor activity of sodium valproate in cultures of human neuroblastoma cells. *Anticancer Drugs* **7**: 766-773.
- CINATL, J., JR., R. KOTCHETKOV, R. BLAHETA, P. H. DRIEVER, J. U. VOGEL *et al.*, 2002 Induction of differentiation and suppression of malignant phenotype of human neuroblastoma BE(2)-C cells by valproic acid: enhancement by combination with interferon-alpha. *Int J Oncol* **20**: 97-106.
- COHEN, H. Y., S. LAVU, K. J. BITTERMAN, B. HEKKING, T. A. IMAHIYEROBO *et al.*, 2004a Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell* **13**: 627-638.
- COHEN, H. Y., C. MILLER, K. J. BITTERMAN, N. R. WALL, B. HEKKING *et al.*, 2004b Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* **305**: 390-392.
- COLOT, V., L. MALOISEL and J. L. ROSSIGNOL, 1999 [DNA repeats and homologous recombination: a probable role for DNA methylation in genome stability of eukaryotic cells]. *J Soc Biol* **193**: 29-34.
- COMB, M., and H. M. GOODMAN, 1990 CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. *Nucleic Acids Res* **18**: 3975-3982.
- CONDORELLI, F., I. GNEMMI, A. VALLARIO, A. A. GENAZZANI and P. L. CANONICO, 2008 Inhibitors of histone deacetylase (HDAC) restore the p53 pathway in neuroblastoma cells. *Br J Pharmacol* **153**: 657-668.
- COSTANZI, C., and J. R. PEHRSON, 1998 Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* **393**: 599-601.
- CUI, H., P. ONYANGO, S. BRANDENBURG, Y. WU, C. L. HSIEH *et al.*, 2002 Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of H19 and IGF2. *Cancer Res* **62**: 6442-6446.
- CUTHBERT, G. L., S. DAUJAT, A. W. SNOWDEN, H. ERDJUMENT-BROMAGE, T. HAGIWARA *et al.*, 2004 Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* **118**: 545-553.
- DEANGELIS, J. T., W. J. FARRINGTON and T. O. TOLLEFSBOL, 2008 An overview of epigenetic assays. *Mol Biotechnol* **38**: 179-183.
- DEQUIEDT, F., H. KASLER, W. FISCHLE, V. KIERMER, M. WEINSTEIN *et al.*, 2003 HDAC7, a thymus-specific class II histone deacetylase, regulates Nur77 transcription and TCR-mediated apoptosis. *Immunity* **18**: 687-698.

- DOBROVIC, A., and D. SIMPFENDORFER, 1997 Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Cancer Res* **57**: 3347-3350.
- DOU, Y., J. BOWEN, Y. LIU and M. A. GOROVSKY, 2002 Phosphorylation and an ATP-dependent process increase the dynamic exchange of H1 in chromatin. *J Cell Biol* **158**: 1161-1170.
- DOU, Y., and M. A. GOROVSKY, 2002 Regulation of transcription by H1 phosphorylation in *Tetrahymena* is position independent and requires clustered sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 6142-6146.
- DOU, Y., X. SONG, Y. LIU and M. A. GOROVSKY, 2005 The H1 phosphorylation state regulates expression of CDC2 and other genes in response to starvation in *Tetrahymena thermophila*. *Mol Cell Biol* **25**: 3914-3922.
- DRYDEN, S. C., F. A. NAHHAS, J. E. NOWAK, A. S. GOUSTIN and M. A. TAINSKY, 2003 Role for human SIRT2 NAD-dependent deacetylase activity in control of mitotic exit in the cell cycle. *Mol Cell Biol* **23**: 3173-3185.
- ERION, D. M., S. YONEMITSU, Y. NIE, Y. NAGAI, M. P. GILLUM *et al.*, 2009 SirT1 knockdown in liver decreases basal hepatic glucose production and increases hepatic insulin responsiveness in diabetic rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 11288-11293.
- ESKELAND, R., A. EBERHARTER and A. IMHOF, 2007 HP1 binding to chromatin methylated at H3K9 is enhanced by auxiliary factors. *Mol Cell Biol* **27**: 453-465.
- ESPADA, J., E. BALLESTAR, M. F. FRAGA, A. VILLAR-GAREA, A. JUARRANZ *et al.*, 2004 Human DNA methyltransferase 1 is required for maintenance of the histone H3 modification pattern. *J Biol Chem* **279**: 37175-37184.
- ESTELLER, M., 2008 Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* **358**: 1148-1159.
- ESTELLER, M., S. R. HAMILTON, P. C. BURGER, S. B. BAYLIN and J. G. HERMAN, 1999 Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* **59**: 793-797.
- FAHRNER, J. A., S. EGUCHI, J. G. HERMAN and S. B. BAYLIN, 2002 Dependence of histone modifications and gene expression on DNA hypermethylation in cancer. *Cancer Res* **62**: 7213-7218.
- FEIGE, J. N., and J. AUWERX, 2008 Transcriptional targets of sirtuins in the coordination of mammalian physiology. *Curr Opin Cell Biol* **20**: 303-309.
- FIRESTEIN, R., G. BLANDER, S. MICHAN, P. OBERDOERFFER, S. OGINO *et al.*, 2008 The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth. *PLoS One* **3**: e2020.
- FOLCO, H. D., A. L. PIDOUX, T. URANO and R. C. ALLSHIRE, 2008 Heterochromatin and RNAi are required to establish CENP-A chromatin at centromeres. *Science* **319**: 94-97.
- FORD, E., R. VOIT, G. LISZT, C. MAGIN, I. GRUMMT *et al.*, 2006 Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. *Genes Dev* **20**: 1075-1080.
- FORD, J., M. JIANG and J. MILNER, 2005 Cancer-specific functions of SIRT1 enable human epithelial cancer cell growth and survival. *Cancer Res* **65**: 10457-10463.
- FOURNEL, M., C. BONFILS, Y. HOU, P. T. YAN, M. C. TRACHY-BOURGET *et al.*, 2008 MGCD0103, a novel isotype-selective histone deacetylase inhibitor, has broad spectrum antitumor activity in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* **7**: 759-768.

- FRAGA, M. F., E. BALLESTAR, M. F. PAZ, S. ROPERO, F. SETIEN *et al.*, 2005a Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 10604-10609.
- FRAGA, M. F., E. BALLESTAR, A. VILLAR-GAREA, M. BOIX-CHORNET, J. ESPADA *et al.*, 2005b Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* **37**: 391-400.
- FRITZSCHE, F. R., W. WEICHERT, A. ROSKE, V. GEKELER, T. BECKERS *et al.*, 2008 Class I histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in renal cell cancer. *BMC Cancer* **8**: 381.
- FU, M., M. LIU, A. A. SAUVE, X. JIAO, X. ZHANG *et al.*, 2006 Hormonal control of androgen receptor function through SIRT1. *Mol Cell Biol* **26**: 8122-8135.
- FURUTA, T., H. TAKEMURA, Z. Y. LIAO, G. J. AUNE, C. REDON *et al.*, 2003 Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J Biol Chem* **278**: 20303-20312.
- GOLL, M. G., and T. H. BESTOR, 2005 Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* **74**: 481-514.
- GREEN, D. R., and G. KROEMER, 2004 The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **305**: 626-629.
- GREGER, V., E. PASSARGE, W. HOPPING, E. MESSMER and B. HORSTHEMKE, 1989 Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet* **83**: 155-158.
- GROB, A., P. ROUSSEL, J. E. WRIGHT, B. MCSTAY, D. HERNANDEZ-VERDUN *et al.*, 2009 Involvement of SIRT7 in resumption of rDNA transcription at the exit from mitosis. *J Cell Sci* **122**: 489-498.
- GROZINGER, C. M., E. D. CHAO, H. E. BLACKWELL, D. MOAZED and S. L. SCHREIBER, 2001 Identification of a class of small molecule inhibitors of the sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening. *J Biol Chem* **276**: 38837-38843.
- GUARENTE, L., 1999 Diverse and dynamic functions of the Sir silencing complex. *Nat Genet* **23**: 281-285.
- GUARENTE, L., and F. PICARD, 2005 Calorie restriction--the SIR2 connection. *Cell* **120**: 473-482.
- GUI, C. Y., L. NGO, W. S. XU, V. M. RICHON and P. A. MARKS, 2004 Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 1241-1246.
- GUPTA, A., G. G. SHARMA, C. S. YOUNG, M. AGARWAL, E. R. SMITH *et al.*, 2005 Involvement of human MOF in ATM function. *Mol Cell Biol* **25**: 5292-5305.
- GURVICH, N., O. M. TSYGANKOVA, J. L. MEINKOTH and P. S. KLEIN, 2004 Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation. *Cancer Res* **64**: 1079-1086.
- HAIGIS, M. C., and L. P. GUARENTE, 2006 Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev* **20**: 2913-2921.
- HAIGIS, M. C., R. MOSTOSLAVSKY, K. M. HAIGIS, K. FAHIE, D. C. CHRISTODOULOU *et al.*, 2006 SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell* **126**: 941-954.

- HALKIDOU, K., S. COOK, H. Y. LEUNG, D. E. NEAL and C. N. ROBSON, 2004 Nuclear accumulation of histone deacetylase 4 (HDAC4) coincides with the loss of androgen sensitivity in hormone refractory cancer of the prostate. *Eur Urol* **45**: 382-389; author reply 389.
- HECHT, A., T. LAROCHE, S. STRAHL-BOLSINGER, S. M. GASSER and M. GRUNSTEIN, 1995 Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* **80**: 583-592.
- HEIDER, U., J. RADEMACHER, B. LAMOTTKE, M. MIETH, M. MOEBS *et al.*, 2009 Synergistic interaction of the histone deacetylase inhibitor SAHA with the proteasome inhibitor bortezomib in cutaneous T cell lymphoma. *Eur J Haematol* **82**: 440-449.
- HELTWEG, B., T. GATBONTON, A. D. SCHULER, J. POSAKONY, H. LI *et al.*, 2006 Antitumor activity of a small-molecule inhibitor of human silent information regulator 2 enzymes. *Cancer Res* **66**: 4368-4377.
- HENGARTNER, M. O., 2000 The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**: 770-776.
- HERMAN, J. G., J. R. GRAFF, S. MYOHANEN, B. D. NELKIN and S. B. BAYLIN, 1996 Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 9821-9826.
- HERSHKO, A., 1983 Ubiquitin: roles in protein modification and breakdown. *Cell* **34**: 11-12.
- HIRATSUKA, M., T. INOUE, T. TODA, N. KIMURA, Y. SHIRAYOSHI *et al.*, 2003 Proteomics-based identification of differentially expressed genes in human gliomas: down-regulation of SIRT2 gene. *Biochem Biophys Res Commun* **309**: 558-566.
- HITCHINS, M. P., J. J. WONG, G. SUTHERS, C. M. SUTER, D. I. MARTIN *et al.*, 2007 Inheritance of a cancer-associated MLH1 germ-line epimutation. *N Engl J Med* **356**: 697-705.
- HOFFMANN, M. J., R. ENGERS, A. R. FLORL, A. P. OTTE, M. MULLER *et al.*, 2007 Expression changes in EZH2, but not in BMI-1, SIRT1, DNMT1 or DNMT3B are associated with DNA methylation changes in prostate cancer. *Cancer Biol Ther* **6**: 1403-1412.
- HOHMANN, P., 1983 Phosphorylation of H1 histones. *Mol Cell Biochem* **57**: 81-92.
- HOHMANN, P. G., D. X. HE and T. B. SHOWS, 1983 Relationship between H1 histone phosphorylation and genome replication in a mouse-Chinese hamster somatic cell hybrid. *Exp Cell Res* **143**: 207-216.
- HOLLIDAY, R., 2006 Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics* **1**: 76-80.
- HSU, T. C., 1962 Differential rate in RNA synthesis between euchromatin and heterochromatin. *Exp Cell Res* **27**: 332-334.
- HUANG, B. H., M. LABAN, C. H. LEUNG, L. LEE, C. K. LEE *et al.*, 2005a Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1. *Cell Death Differ* **12**: 395-404.
- HUANG, S., M. LITT and G. FELSENFELD, 2005b Methylation of histone H4 by arginine methyltransferase PRMT1 is essential in vivo for many subsequent histone modifications. *Genes Dev* **19**: 1885-1893.
- HUHTINIEMI, T., C. WITTEKINDT, T. LAITINEN, J. LEPPANEN, A. SALMINEN *et al.*, 2006 Comparative and pharmacophore model for deacetylase SIRT1. *J Comput Aided Mol Des* **20**: 589-599.

- ICHIKAWA, Y., S. YOSHIDA, Y. KOYAMA, M. HIRAI, T. ISHIKAWA *et al.*, 1996
Inactivation of p16/CDKN2 and p15/MTS2 genes in different histological types and clinical stages of primary ovarian tumors. *Int J Cancer* **69**: 466-470.
- IGUCHI-ARIGA, S. M., and W. SCHAFFNER, 1989 CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev* **3**: 612-619.
- INOUE, T., M. HIRATSUKA, M. OSAKI and M. OSHIMURA, 2007a The molecular biology of mammalian SIRT proteins: SIRT2 in cell cycle regulation. *Cell Cycle* **6**: 1011-1018.
- INOUE, T., M. HIRATSUKA, M. OSAKI, H. YAMADA, I. KISHIMOTO *et al.*, 2007b SIRT2, a tubulin deacetylase, acts to block the entry to chromosome condensation in response to mitotic stress. *Oncogene* **26**: 945-957.
- INOUE, T., Y. NAKAYAMA, H. YAMADA, Y. C. LI, S. YAMAGUCHI *et al.*, 2009 SIRT2 downregulation confers resistance to microtubule inhibitors by prolonging chronic mitotic arrest. *Cell Cycle* **8**: 1279-1291.
- ISHIHAMA, K., M. YAMAKAWA, S. SEMBA, H. TAKEDA, S. KAWATA *et al.*, 2007
Expression of HDAC1 and CBP/p300 in human colorectal carcinomas. *J Clin Pathol* **60**: 1205-1210.
- JACOBS, K. M., J. D. PENNINGTON, K. S. BISHT, N. AYKIN-BURNS, H. S. KIM *et al.*, 2008 SIRT3 interacts with the daf-16 homolog FOXO3a in the mitochondria, as well as increases FOXO3a dependent gene expression. *Int J Biol Sci* **4**: 291-299.
- JACOBSEN, F., A. BARANISKIN, J. MERTENS, D. MITTLER, A. MOHAMMADI-TABRISI *et al.*, 2005 Activity of histone H1.2 in infected burn wounds. *J Antimicrob Chemother* **55**: 735-741.
- JANG, K. Y., S. H. HWANG, K. S. KWON, K. R. KIM, H. N. CHOI *et al.*, 2008 SIRT1 expression is associated with poor prognosis of diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* **32**: 1523-1531.
- JENUWEIN, T., and C. D. ALLIS, 2001 Translating the histone code. *Science* **293**: 1074-1080.
- JIN, Y. H., Y. J. KIM, D. W. KIM, K. H. BAEK, B. Y. KANG *et al.*, 2008 Sirt2 interacts with 14-3-3 beta/gamma and down-regulates the activity of p53. *Biochem Biophys Res Commun* **368**: 690-695.
- JONES, G., P. WILLETT, R. C. GLEN, A. R. LEACH and R. TAYLOR, 1997
Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol* **267**: 727-748.
- JONES, P. L., G. J. VEENSTRA, P. A. WADE, D. VERMAAK, S. U. KASS *et al.*, 1998
Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* **19**: 187-191.
- JU, B. G., and M. G. ROSENFELD, 2006 A breaking strategy for topoisomerase IIbeta/PARP-1-dependent regulated transcription. *Cell Cycle* **5**: 2557-2560.
- JUAN, L. J., W. J. SHIA, M. H. CHEN, W. M. YANG, E. SETO *et al.*, 2000 Histone deacetylases specifically down-regulate p53-dependent gene activation. *J Biol Chem* **275**: 20436-20443.
- KARKHANINA, A. A., J. MECINOVIC, M. U. MUSHEEV, S. M. KRYLOVA, A. P. PETROV *et al.*, 2009 Direct analysis of enzyme-catalyzed DNA demethylation. *Anal Chem* **81**: 5871-5875.

- KAWAHARA, T. L., E. MICHISHITA, A. S. ADLER, M. DAMIAN, E. BERBER *et al.*, 2009 SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. *Cell* **136**: 62-74.
- KELLY, W. K., and P. A. MARKS, 2005 Drug insight: Histone deacetylase inhibitors--development of the new targeted anticancer agent suberoylanilide hydroxamic acid. *Nat Clin Pract Oncol* **2**: 150-157.
- KHAN, A. U., and M. HAMPSEY, 2002 Connecting the DOTs: covalent histone modifications and the formation of silent chromatin. *Trends Genet* **18**: 387-389.
- KHAN, N., M. JEFFERS, S. KUMAR, C. HACKETT, F. BOLDOG *et al.*, 2008 Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors. *Biochem J* **409**: 581-589.
- KIM, E. J., J. H. KHO, M. R. KANG and S. J. UM, 2007a Active regulator of SIRT1 cooperates with SIRT1 and facilitates suppression of p53 activity. *Mol Cell* **28**: 277-290.
- KIM, J., J. DANIEL, A. ESPEJO, A. LAKE, M. KRISHNA *et al.*, 2006 Tudor, MBT and chromo domains gauge the degree of lysine methylation. *EMBO Rep* **7**: 397-403.
- KIM, J., H. PARK, J. Y. IM, W. S. CHOI and H. S. KIM, 2007b Sodium butyrate regulates androgen receptor expression and cell cycle arrest in human prostate cancer cells. *Anticancer Res* **27**: 3285-3292.
- KIVIRANTA, P. H., J. LEPPANEN, V. M. RINNE, T. SUURONEN, O. KYRYLENKO *et al.*, 2007 N-(3-(4-Hydroxyphenyl)-propenoyl)-amino acid tryptamides as SIRT2 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **17**: 2448-2451.
- KOBAYASHI, Y., Y. FURUKAWA-HIBI, C. CHEN, Y. HORIO, K. ISOBE *et al.*, 2005 SIRT1 is critical regulator of FOXO-mediated transcription in response to oxidative stress. *Int J Mol Med* **16**: 237-243.
- KOJIMA, K., R. OHASHI, Y. FUJITA, N. HAMADA, Y. AKAO *et al.*, 2008 A role for SIRT1 in cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 and DU145 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **373**: 423-428.
- KOTHAPALLI, N., G. SARATH and J. ZEMPLINI, 2005 Biotinylation of K12 in histone H4 decreases in response to DNA double-strand breaks in human JAr choriocarcinoma cells. *J Nutr* **135**: 2337-2342.
- KOUZARIDES, T., 2007 Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**: 693-705.
- KROGAN, N. J., K. BAETZ, M. C. KEOGH, N. DATTA, C. SAWA *et al.*, 2004 Regulation of chromosome stability by the histone H2A variant Htz1, the Swr1 chromatin remodeling complex, and the histone acetyltransferase NuA4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 13513-13518.
- KURDISTANI, S. K., S. TAVAZOIE and M. GRUNSTEIN, 2004 Mapping global histone acetylation patterns to gene expression. *Cell* **117**: 721-733.
- LADURNER, A. G., C. INOUE, R. JAIN and R. TJIAN, 2003 Bromodomains mediate an acetyl-histone encoded antisilencing function at heterochromatin boundaries. *Mol Cell* **11**: 365-376.
- LAIN, S., J. J. HOLLICK, J. CAMPBELL, O. D. STAPLES, M. HIGGINS *et al.*, 2008 Discovery, in vivo activity, and mechanism of action of a small-molecule p53 activator. *Cancer Cell* **13**: 454-463.
- LEE, D. Y., C. TEYSSIER, B. D. STRAHL and M. R. STALLCUP, 2005 Role of protein methylation in regulation of transcription. *Endocr Rev* **26**: 147-170.

- LI, E., 2002 Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* **3**: 662-673.
- LI, L., G. ZHANG, Y. ZHANG, J. TAN, H. HUANG *et al.*, 2008 Sodium butyrate-induced upregulation of p18(INK4C) gene affects K562 cell G (0)/G (1) arrest and differentiation. *Mol Cell Biochem* **319**: 9-15.
- LI, W., S. NAGARAJA, G. P. DELCUVE, M. J. HENDZEL and J. R. DAVIE, 1993 Effects of histone acetylation, ubiquitination and variants on nucleosome stability. *Biochem J* **296 (Pt 3)**: 737-744.
- LIN, H. Y., C. S. CHEN, S. P. LIN, J. R. WENG and C. S. CHEN, 2006 Targeting histone deacetylase in cancer therapy. *Med Res Rev* **26**: 397-413.
- LIU, T., P. Y. LIU and G. M. MARSHALL, 2009 The critical role of the class III histone deacetylase SIRT1 in cancer. *Cancer Res* **69**: 1702-1705.
- LIVAK, K. J., and T. D. SCHMITTGEN, 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408.
- LORINCZ, M. C., D. R. DICKERSON, M. SCHMITT and M. GROUDINE, 2004 Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 1068-1075.
- LU, A., A. ZOUGMAN, M. PUDELKO, M. BEBENEK, P. ZIOLKOWSKI *et al.*, 2009 Mapping of lysine monomethylation of linker histones in human breast and its cancer. *J Proteome Res* **8**: 4207-4215.
- LUGER, K., A. W. MADER, R. K. RICHMOND, D. F. SARGENT and T. J. RICHMOND, 1997 Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**: 251-260.
- LUO, J., A. Y. NIKOLAEV, S. IMAI, D. CHEN, F. SU *et al.*, 2001 Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* **107**: 137-148.
- MA, W., L. J. STAFFORD, D. LI, J. LUO, X. LI *et al.*, 2007 GCIP/CCNDBP1, a helix-loop-helix protein, suppresses tumorigenesis. *J Cell Biochem* **100**: 1376-1386.
- MAHADEVAN, L. C., A. C. WILLIS and M. J. BARRATT, 1991 Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors. *Cell* **65**: 775-783.
- MAI, A., S. MASSA, S. LAVU, R. PEZZI, S. SIMEONI *et al.*, 2005 Design, synthesis, and biological evaluation of sirtinol analogues as class III histone/protein deacetylase (Sirtuin) inhibitors. *J Med Chem* **48**: 7789-7795.
- MARCHION, D. C., E. BICAKU, A. I. DAUD, D. M. SULLIVAN and P. N. MUNSTER, 2005 Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins. *Cancer Res* **65**: 3815-3822.
- MARGUERON, R., P. TROJER and D. REINBERG, 2005 The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev* **15**: 163-176.
- MARIADASON, J. M., 2008 HDACs and HDAC inhibitors in colon cancer. *Epigenetics* **3**: 28-37.
- MATTHEWS, A. G., A. J. KUO, S. RAMON-MAIQUES, S. HAN, K. S. CHAMPAGNE *et al.*, 2007 RAG2 PHD finger couples histone H3 lysine 4 trimethylation with V(D)J recombination. *Nature* **450**: 1106-1110.
- MAYER, W., A. NIVELEAU, J. WALTER, R. FUNDELE and T. HAAF, 2000 Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* **403**: 501-502.
- MEDINA, V., J. J. AFONSO, H. ALVAREZ-ARGUELLES, C. HERNANDEZ and F. GONZALEZ, 1998 Sodium butyrate inhibits carcinoma development in a

- 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon cancer. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **22**: 14-17.
- MICHISHITA, E., R. A. MCCORD, E. BERBER, M. KIOI, H. PADILLA-NASH *et al.*, 2008 SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature* **452**: 492-496.
- MILNE, J. C., P. D. LAMBERT, S. SCHENK, D. P. CARNEY, J. J. SMITH *et al.*, 2007 Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature* **450**: 712-716.
- MINUCCI, S., and P. G. PELICCI, 2006 Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* **6**: 38-51.
- MOLIFE, L. R., G. ATTARD, P. C. FONG, V. KARAVASILIS, A. H. REID *et al.*, 2009 Phase II, two-stage, single-arm trial of the histone deacetylase inhibitor (HDACi) romidepsin in metastatic castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Ann Oncol*.
- MOORE, L. E., R. M. PFEIFFER, C. POSCABLO, F. X. REAL, M. KOGEVINAS *et al.*, 2008 Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case-control study. *Lancet Oncol* **9**: 359-366.
- MORINIERE, J., S. ROUSSEAU, U. STEUERWALD, M. SOLER-LOPEZ, S. CURTET *et al.*, 2009 Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature* **461**: 664-668.
- MOSTOSLAVSKY, R., K. F. CHUA, D. B. LOMBARD, W. W. PANG, M. R. FISCHER *et al.*, 2006 Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* **124**: 315-329.
- MUKHOPADHYAY, N. K., G. J. GORDON, G. MAULIK, G. DOERRE, B. C. LIU *et al.*, 2005 Histone deacetylation is directly involved in desilencing the expression of the catalytic subunit of telomerase in normal lung fibroblast. *J Cell Mol Med* **9**: 662-669.
- MUNSHI, A., G. SHAFI, N. ALIYA and A. JYOTHY, 2009 Histone modifications dictate specific biological readouts. *J Genet Genomics* **36**: 75-88.
- MURAYAMA, A., K. OHMORI, A. FUJIMURA, H. MINAMI, K. YASUZAWA-TANAKA *et al.*, 2008 Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status. *Cell* **133**: 627-639.
- NAKAGAWA, T., D. J. LOMB, M. C. HAIGIS and L. GUARENTE, 2009 SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle. *Cell* **137**: 560-570.
- NAKAMURA, Y., M. OGURA, D. TANAKA and N. INAGAKI, 2008 Localization of mouse mitochondrial SIRT proteins: shift of SIRT3 to nucleus by co-expression with SIRT5. *Biochem Biophys Res Commun* **366**: 174-179.
- NAPPER, A. D., J. HIXON, T. McDONAGH, K. KEAVEY, J. F. PONS *et al.*, 2005 Discovery of indoles as potent and selective inhibitors of the deacetylase SIRT1. *J Med Chem* **48**: 8045-8054.
- NARANG, M. A., R. DUMAS, L. M. AYER and R. A. GRAVEL, 2004 Reduced histone biotinylation in multiple carboxylase deficiency patients: a nuclear role for holocarboxylase synthetase. *Hum Mol Genet* **13**: 15-23.
- NATHAN, D., K. INGVARSDOTTIR, D. E. STERNER, G. R. BYLEBYL, M. DOKMANOVIC *et al.*, 2006 Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes Dev* **20**: 966-976.

- NEMOTO, S., M. M. FERGUSON and T. FINKEL, 2004 Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. *Science* **306**: 2105-2108.
- NEUMEYER, D. D., and S. FERGUSON-MILLER, 2003 Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* **112**: 481-490.
- NG, H. H., Q. FENG, H. WANG, H. ERDJUMENT-BROMAGE, P. TEMPST *et al.*, 2002 Lysine methylation within the globular domain of histone H3 by Dot1 is important for telomeric silencing and Sir protein association. *Genes Dev* **16**: 1518-1527.
- NG, H. H., F. ROBERT, R. A. YOUNG and K. STRUHL, 2003 Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol Cell* **11**: 709-719.
- NORTH, B. J., B. L. MARSHALL, M. T. BORRA, J. M. DENU and E. VERDIN, 2003 The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell* **11**: 437-444.
- NOSHO, K., K. SHIMA, N. IRAHARA, S. KURE, R. FIRESTEIN *et al.*, 2009 SIRT1 histone deacetylase expression is associated with microsatellite instability and CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Mod Pathol* **22**: 922-932.
- O'HAGAN, H. M., H. P. MOHAMMAD and S. B. BAYLIN, 2008 Double strand breaks can initiate gene silencing and SIRT1-dependent onset of DNA methylation in an exogenous promoter CpG island. *PLoS Genet* **4**: e1000155.
- OBERDOERFFER, P., S. MICHAN, M. MCVAY, R. MOSTOSLAVSKY, J. VANN *et al.*, 2008 SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell* **135**: 907-918.
- OGI, K., M. TOYOTA, H. MITA, A. SATOH, L. KASHIMA *et al.*, 2005 Small interfering RNA-induced CHFR silencing sensitizes oral squamous cell cancer cells to microtubule inhibitors. *Cancer Biol Ther* **4**: 773-780.
- OKANO, M., D. W. BELL, D. A. HABER and E. LI, 1999 DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**: 247-257.
- ONO, T., N. TAKAHASHI and S. OKADA, 1989 Age-associated changes in DNA methylation and mRNA level of the c-myc gene in spleen and liver of mice. *Mutat Res* **219**: 39-50.
- OSWALD, J., S. ENGEMANN, N. LANE, W. MAYER, A. OLEK *et al.*, 2000 Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol* **10**: 475-478.
- OTA, H., E. TOKUNAGA, K. CHANG, M. HIKASA, K. IJIMA *et al.*, 2006 Sirt1 inhibitor, Sirtinol, induces senescence-like growth arrest with attenuated Ras-MAPK signaling in human cancer cells. *Oncogene* **25**: 176-185.
- OUTEIRO, T. F., E. KONTOPOULOS, S. M. ALTMANN, I. KUFAREVA, K. E. STRATHEARN *et al.*, 2007 Sirtuin 2 inhibitors rescue alpha-synuclein-mediated toxicity in models of Parkinson's disease. *Science* **317**: 516-519.
- PAGANS, S., A. PEDAL, B. J. NORTH, K. KAEHLCKE, B. L. MARSHALL *et al.*, 2005 SIRT1 regulates HIV transcription via Tat deacetylation. *PLoS Biol* **3**: e41.
- PARKS, B. A., L. JIANG, P. M. THOMAS, C. D. WENGER, M. J. ROTH *et al.*, 2007 Top-down proteomics on a chromatographic time scale using linear ion

- trap fourier transform hybrid mass spectrometers. *Anal Chem* **79**: 7984-7991.
- PARTHUN, M. R., J. WIDOM and D. E. GOTTSCHLING, 1996 The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism. *Cell* **87**: 85-94.
- PETERS, A. H., D. O'CARROLL, H. SCHERTHAN, K. MECHTLER, S. SAUER *et al.*, 2001 Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* **107**: 323-337.
- PETERS, D. M., J. B. GRIFFIN, J. S. STANLEY, M. M. BECK and J. ZEMPLIENI, 2002 Exposure to UV light causes increased biotinylation of histones in Jurkat cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**: C878-884.
- PETRELLA, A., C. W. D'ACUNTO, M. RODRIQUEZ, M. FESTA, A. TOSCO *et al.*, 2008 Effects of FR235222, a novel HDAC inhibitor, in proliferation and apoptosis of human leukaemia cell lines: role of annexin A1. *Eur J Cancer* **44**: 740-749.
- PICARD, F., M. KURTEV, N. CHUNG, A. TOPARK-NGARM, T. SENAWONG *et al.*, 2004 Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* **429**: 771-776.
- PIPERNO, G., M. LEDIZET and X. J. CHANG, 1987 Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture. *J Cell Biol* **104**: 289-302.
- PIVA, R., G. BELARDO and M. G. SANTORO, 2006 NF-kappaB: a stress-regulated switch for cell survival. *Antioxid Redox Signal* **8**: 478-486.
- POTENTE, M., L. GHAENI, D. BALDESSARI, R. MOSTOSLAVSKY, L. ROSSIG *et al.*, 2007 SIRT1 controls endothelial angiogenic functions during vascular growth. *Genes Dev* **21**: 2644-2658.
- PRAY-GRANT, M. G., J. A. DANIEL, D. SCHIELTZ, J. R. YATES, 3RD and P. A. GRANT, 2005 Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature* **433**: 434-438.
- PRUITT, K., R. L. ZINN, J. E. OHM, K. M. MCGARVEY, S. H. KANG *et al.*, 2006 Inhibition of SIRT1 reactivates silenced cancer genes without loss of promoter DNA hypermethylation. *PLoS Genet* **2**: e40.
- QIAN, D. Z., Y. F. WEI, X. WANG, Y. KATO, L. CHENG *et al.*, 2007 Antitumor activity of the histone deacetylase inhibitor MS-275 in prostate cancer models. *Prostate* **67**: 1182-1193.
- RANGASAMY, D., L. BERVEN, P. RIDGWAY and D. J. TREMETHICK, 2003 Pericentric heterochromatin becomes enriched with H2A.Z during early mammalian development. *Embo J* **22**: 1599-1607.
- REIK, W., W. DEAN and J. WALTER, 2001 Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **293**: 1089-1093.
- RICHMOND, T. J., and C. A. DAVEY, 2003 The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature* **423**: 145-150.
- ROBERTSON, K. D., S. AIT-SI-ALI, T. YOKOCHI, P. A. WADE, P. L. JONES *et al.*, 2000 DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet* **25**: 338-342.
- ROBERTSON, K. D., and P. A. JONES, 2000 DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis* **21**: 461-467.
- ROBZYK, K., J. RECHT and M. A. OSLEY, 2000 Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science* **287**: 501-504.

- RODRIGUES, N. R., A. ROWAN, M. E. SMITH, I. B. KERR, W. F. BODMER *et al.*, 1990 p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 7555-7559.
- ROGAKOU, E. P., C. BOON, C. REDON and W. M. BONNER, 1999 Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* **146**: 905-916.
- ROPERO, S., M. F. FRAGA, E. BALLESTAR, R. HAMELIN, H. YAMAMOTO *et al.*, 2006 A truncating mutation of HDAC2 in human cancers confers resistance to histone deacetylase inhibition. *Nat Genet* **38**: 566-569.
- ROUGEULLE, C., J. CHAUMEIL, K. SARMA, C. D. ALLIS, D. REINBERG *et al.*, 2004 Differential histone H3 Lys-9 and Lys-27 methylation profiles on the X chromosome. *Mol Cell Biol* **24**: 5475-5484.
- SAEMANN, M. D., G. A. BOHMIG, C. H. OSTERREICHER, H. BURTSCHER, O. PAROLINI *et al.*, 2000 Anti-inflammatory effects of sodium butyrate on human monocytes: potent inhibition of IL-12 and up-regulation of IL-10 production. *Faseb J* **14**: 2380-2382.
- SANDERS, S. L., M. PORTOSO, J. MATA, J. BAHLER, R. C. ALLSHIRE *et al.*, 2004 Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. *Cell* **119**: 603-614.
- SANTOS-ROSA, H., and C. CALDAS, 2005 Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer* **41**: 2381-2402.
- SAWADA, M., W. SUN, P. HAYES, K. LESKOV, D. A. BOOTHMAN *et al.*, 2003 Ku70 suppresses the apoptotic translocation of Bax to mitochondria. *Nat Cell Biol* **5**: 320-329.
- SCHER, M. B., A. VAQUERO and D. REINBERG, 2007 SirT3 is a nuclear NAD⁺-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress. *Genes Dev* **21**: 920-928.
- SCHLICKER, C., M. GERTZ, P. PAPTAEODOROU, B. KACHHOLZ, C. F. BECKER *et al.*, 2008 Substrates and regulation mechanisms for the human mitochondrial sirtuins Sirt3 and Sirt5. *J Mol Biol* **382**: 790-801.
- SCHUETZ, A., J. MIN, T. ANTOSHENKO, C. L. WANG, A. ALLALI-HASSANI *et al.*, 2007 Structural basis of inhibition of the human NAD⁺-dependent deacetylase SIRT5 by suramin. *Structure* **15**: 377-389.
- SCHWER, B., J. BUNKENBORG, R. O. VERDIN, J. S. ANDERSEN and E. VERDIN, 2006 Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 10224-10229.
- SCHWER, B., B. J. NORTH, R. A. FRYE, M. OTT and E. VERDIN, 2002 The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase. *J Cell Biol* **158**: 647-657.
- SELIGSON, D. B., S. HORVATH, T. SHI, H. YU, S. TZE *et al.*, 2005 Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature* **435**: 1262-1266.
- SHANKAR, S., R. DAVIS, K. P. SINGH, R. KURZROCK, D. D. ROSS *et al.*, 2009 Suberoylanilide hydroxamic acid (Zolanza/vorinostat) sensitizes TRAIL-resistant breast cancer cells orthotopically implanted in BALB/c nude mice. *Mol Cancer Ther* **8**: 1596-1605.

- SHI, Y., F. LAN, C. MATSON, P. MULLIGAN, J. R. WHETSTINE *et al.*, 2004 Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**: 941-953.
- SHOGRÉN-KNAAK, M., H. ISHII, J. M. SUN, M. J. PAZIN, J. R. DAVIE *et al.*, 2006 Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* **311**: 844-847.
- SOLOMON, J. M., R. PASUPULETI, L. XU, T. McDONAGH, R. CURTIS *et al.*, 2006 Inhibition of SIRT1 catalytic activity increases p53 acetylation but does not alter cell survival following DNA damage. *Mol Cell Biol* **26**: 28-38.
- STEGER, D. J., M. I. LEFTEROVA, L. YING, A. J. STONESTROM, M. SCHUPP *et al.*, 2008 DOT1L/KMT4 recruitment and H3K79 methylation are ubiquitously coupled with gene transcription in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **28**: 2825-2839.
- STRASSER, A., L. O'CONNOR and V. M. DIXIT, 2000 Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* **69**: 217-245.
- STUNKEL, W., B. K. PEH, Y. C. TAN, V. M. NAYAGAM, X. WANG *et al.*, 2007 Function of the SIRT1 protein deacetylase in cancer. *Biotechnol J* **2**: 1360-1368.
- SUN, Y., D. SUN, F. LI, L. TIAN, C. LI *et al.*, 2007 Downregulation of Sirt1 by antisense oligonucleotides induces apoptosis and enhances radiation sensitization in A549 lung cancer cells. *Lung Cancer* **58**: 21-29.
- SUZUKI, T., T. ASABA, E. IMAI, H. TSUMOTO, H. NAKAGAWA *et al.*, 2009 Identification of a cell-active non-peptide sirtuin inhibitor containing N-thioacetyl lysine. *Bioorg Med Chem Lett* **19**: 5670-5672.
- TAKEUCHI, T., Y. YAMAZAKI, Y. KATOH-FUKUI, R. TSUCHIYA, S. KONDO *et al.*, 1995 Gene trap capture of a novel mouse gene, jumonji, required for neural tube formation. *Genes Dev* **9**: 1211-1222.
- TH'NG, J. P., R. SUNG, M. YE and M. J. HENDZEL, 2005 H1 family histones in the nucleus. Control of binding and localization by the C-terminal domain. *J Biol Chem* **280**: 27809-27814.
- THATCHER, T. H., and M. A. GOROVSKY, 1994 Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3, and H4. *Nucleic Acids Res* **22**: 174-179.
- TRAPP, J., R. MEIER, D. HONGWISSET, M. U. KASSACK, W. SIPPL *et al.*, 2007 Structure-activity studies on suramin analogues as inhibitors of NAD⁺-dependent histone deacetylases (sirtuins). *ChemMedChem* **2**: 1419-1431.
- TSENG, R. C., C. C. LEE, H. S. HSU, C. TZAO and Y. C. WANG, 2009 Distinct HIC1-SIRT1-p53 loop deregulation in lung squamous carcinoma and adenocarcinoma patients. *Neoplasia* **11**: 763-770.
- UCIECHOWSKA, U., J. SCHEMIES, R. C. NEUGEBAUER, E. M. HUDA, M. L. SCHMITT *et al.*, 2008 Thiobarbiturates as sirtuin inhibitors: virtual screening, free-energy calculations, and biological testing. *ChemMedChem* **3**: 1965-1976.
- VAN LEEUWEN, F., P. R. GAFKEN and D. E. GOTTSCHLING, 2002 Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core. *Cell* **109**: 745-756.
- VAN LEEUWEN, I., and S. LAIN, 2009 Sirtuins and p53. *Adv Cancer Res* **102**: 171-195.

- VANI, G., A. J. VANISREE and C. S. SHYAMALADEVI, 2006 Histone H1 inhibits the proliferation of MCF 7 and MDA MB 231 human breast cancer cells. *Cell Biol Int* **30**: 326-331.
- VAQUERO, A., M. SCHER, D. LEE, H. ERDJUMENT-BROMAGE, P. TEMPST *et al.*, 2004 Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol Cell* **16**: 93-105.
- VAQUERO, A., M. B. SCHER, D. H. LEE, A. SUTTON, H. L. CHENG *et al.*, 2006 SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes Dev* **20**: 1256-1261.
- VAZIRI, H., S. K. DESSAIN, E. NG EATON, S. I. IMAI, R. A. FRYE *et al.*, 2001 hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* **107**: 149-159.
- VERGNES, B., L. VANHILLE, A. OUAISSI and D. SERENO, 2005 Stage-specific antileishmanial activity of an inhibitor of SIR2 histone deacetylase. *Acta Trop* **94**: 107-115.
- VERREULT, A., P. D. KAUFMAN, R. KOBAYASHI and B. STILLMAN, 1998 Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human Hat1 acetyltransferase. *Curr Biol* **8**: 96-108.
- VILLAR-GAREA, A., L. ISRAEL and A. IMHOF, 2008 Analysis of histone modifications by mass spectrometry. *Curr Protoc Protein Sci* **Chapter 14**: Unit 14 10.
- VIRE, B., S. DE WALQUE, A. RESTOUIN, D. OLIVE, C. VAN LINT *et al.*, 2009 Anti-leukemia activity of MS-275 histone deacetylase inhibitor implicates 4-1BBL/4-1BB immunomodulatory functions. *PLoS One* **4**: e7085.
- VON BURSTIN, J., S. ESER, M. C. PAUL, B. SEIDLER, M. BRANDL *et al.*, 2009 E-cadherin regulates metastasis of pancreatic cancer in vivo and is suppressed by a SNAIL/HDAC1/HDAC2 repressor complex. *Gastroenterology* **137**: 361-371, 371 e361-365.
- WADDINGTON, C., 1942 The epigenotype. *Endeavour* **1**: 18-20.
- WADE, P. A., A. GEGONNE, P. L. JONES, E. BALLESTAR, F. AUBRY *et al.*, 1999 Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nat Genet* **23**: 62-66.
- WALSH, C. P., and T. H. BESTOR, 1999 Cytosine methylation and mammalian development. *Genes Dev* **13**: 26-34.
- WANG, C., L. CHEN, X. HOU, Z. LI, N. KABRA *et al.*, 2006 Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage. *Nat Cell Biol* **8**: 1025-1031.
- WANG, F., and Q. TONG, 2009 SIRT2 suppresses adipocyte differentiation by deacetylating FOXO1 and enhancing FOXO1's repressive interaction with PPARgamma. *Mol Biol Cell* **20**: 801-808.
- WANG, R. H., Y. ZHENG, H. S. KIM, X. XU, L. CAO *et al.*, 2008 Interplay among BRCA1, SIRT1, and Survivin during BRCA1-associated tumorigenesis. *Mol Cell* **32**: 11-20.
- WEI, Y., L. YU, J. BOWEN, M. A. GOROVSKY and C. D. ALLIS, 1999 Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* **97**: 99-109.
- WEICHERT, W., A. ROSKE, V. GEKELER, T. BECKERS, C. STEPHAN *et al.*, 2008 Histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in prostate cancer and HDAC2 expression is associated with shorter PSA relapse time after radical prostatectomy. *Br J Cancer* **98**: 604-610.

- WHITELAW, N. C., and E. WHITELAW, 2006 How lifetimes shape epigenotype within and across generations. *Hum Mol Genet* **15 Spec No 2**: R131-137.
- WITT, O., H. E. DEUBZER, T. MILDE and I. OEHME, 2009 HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett* **277**: 8-21.
- WOO, S., E. R. GARDNER, X. CHEN, S. B. OCKERS, C. E. BAUM *et al.*, 2009 Population pharmacokinetics of romidepsin in patients with cutaneous T-cell lymphoma and relapsed peripheral T-cell lymphoma. *Clin Cancer Res* **15**: 1496-1503.
- WU, R. S., K. W. KOHN and W. M. BONNER, 1981 Metabolism of ubiquitinated histones. *J Biol Chem* **256**: 5916-5920.
- YAMAKUCHI, M., M. FERLITO and C. J. LOWENSTEIN, 2008 miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 13421-13426.
- YANG, T., M. FU, R. PESTELL and A. A. SAUVE, 2006 SIRT1 and endocrine signaling. *Trends Endocrinol Metab* **17**: 186-191.
- YANG, Y., W. FU, J. CHEN, N. OLASHAW, X. ZHANG *et al.*, 2007 SIRT1 sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular response to genotoxic stress. *Nat Cell Biol* **9**: 1253-1262.
- YEH, C. C., Y. T. DENG, D. Y. SHA, M. HSIAO and M. Y. KUO, 2009 Suberoylanilide hydroxamic acid sensitizes human oral cancer cells to TRAIL-induced apoptosis through increase DR5 expression. *Mol Cancer Ther* **8**: 2718-2725.
- YEUNG, F., J. E. HOBERG, C. S. RAMSEY, M. D. KELLER, D. R. JONES *et al.*, 2004 Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *Embo J* **23**: 2369-2380.
- YODER, J. A., C. P. WALSH and T. H. BESTOR, 1997 Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* **13**: 335-340.
- YOSHIDA, M., S. NOMURA and T. BEPPU, 1987 Effects of trichostatins on differentiation of murine erythroleukemia cells. *Cancer Res* **47**: 3688-3691.
- YU, X. D., S. Y. WANG, G. A. CHEN, C. M. HOU, M. ZHAO *et al.*, 2007 Apoptosis induced by depsipeptide FK228 coincides with inhibition of survival signaling in lung cancer cells. *Cancer J* **13**: 105-113.
- YU, Y., Y. TENG, H. LIU, S. H. REED and R. WATERS, 2005 UV irradiation stimulates histone acetylation and chromatin remodeling at a repressed yeast locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 8650-8655.
- YUAN, Z., X. ZHANG, N. SENGUPTA, W. S. LANE and E. SETO, 2007 SIRT1 regulates the function of the Nijmegen breakage syndrome protein. *Mol Cell* **27**: 149-162.
- ZHANG, C. L., T. A. MCKINSEY, S. CHANG, C. L. ANTOS, J. A. HILL *et al.*, 2002 Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell* **110**: 479-488.
- ZHANG, F., T. ZHANG, Z. H. TENG, R. ZHANG, J. B. WANG *et al.*, 2009a Sensitization to gamma-irradiation-induced cell cycle arrest and apoptosis by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. *Cancer Biol Ther* **8**: 823-831.
- ZHANG, Y., Q. AU, M. ZHANG, J. R. BARBER, S. C. NG *et al.*, 2009b Identification of a small molecule SIRT2 inhibitor with selective tumor cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* **386**: 729-733.

- ZHANG, Y., and D. REINBERG, 2001 Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* **15**: 2343-2360.
- ZHANG, Y., M. ZHANG, H. DONG, S. YONG, X. LI *et al.*, 2009c Deacetylation of cortactin by SIRT1 promotes cell migration. *Oncogene* **28**: 445-460.
- ZHAO, W., J. P. KRUSE, Y. TANG, S. Y. JUNG, J. QIN *et al.*, 2008 Negative regulation of the deacetylase SIRT1 by DBC1. *Nature* **451**: 587-590.
- ZHU, B., Y. ZHENG, A. D. PHAM, S. S. MANDAL, H. ERDJUMENT-BROMAGE *et al.*, 2005 Monoubiquitination of human histone H2B: the factors involved and their roles in HOX gene regulation. *Mol Cell* **20**: 601-611.
- ZHU, J. K., 2009 Active DNA Demethylation Mediated by DNA Glycosylases. *Annu Rev Genet*.
- ZHU, Q., G. WANI, H. H. ARAB, M. A. EL-MAHDY, A. RAY *et al.*, 2009 Chromatin restoration following nucleotide excision repair involves the incorporation of ubiquitinated H2A at damaged genomic sites. *DNA Repair (Amst)* **8**: 262-273.
- ZILBERMAN, Y., C. BALLESTREM, L. CARRAMUSA, R. MAZITSCHK, S. KHOCHBIN *et al.*, 2009 Regulation of microtubule dynamics by inhibition of the tubulin deacetylase HDAC6. *J Cell Sci* **122**: 3531-3541.

